

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I
(Direktor: Prof. Dr. Martin Schrappe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Methotrexat-assoziierte Toxizität bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie und Down Syndrom

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Mirko Kroll
aus Kassel

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gunnar Cario,
Klinik für Kinder und Jugendmedizin I
2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi,
Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie

Tag der mündlichen Prüfung: 24.08.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 29.04.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Einleitung	1
Akute lymphoblastische Leukämien im Kindes- und Jugendalter	1
Therapie der pädiatrischen ALL nach dem Protokoll der internationalen, multizentrischen Therapieoptimierungsstudie AIEOP-BFM ALL 2000	3
Down Syndrom	5
Leukämie bei Kindern mit Down Syndrom	5
Akute lymphoblastische Leukämie bei Kindern mit Down Syndrom	6
Methotrexat	8
Methotrexat-assoziierte Toxizitäten	9
Folat-Transporter SLC19A1/RFC1	10
Polymorphismus G80A (rs1051266)	12
Ziel dieser Arbeit	12
Material und Methoden	15
Patientenkohorte	15
Therapieelement Protokoll M	15
Toxizitäten, MTX-Plasmaspiegel und Dokumentation	17
Statistik	18
Patientenmaterial DNA	18
Allelic discrimination assay	20
Ergebnisse	22
1. Patientenkohorte	22
2. Verabreichte MTX-Dosis und Dosisveränderungen in Protokoll M	24
3. Untersuchung der Toxizitätsausprägungen nach dem ersten HD-MTX-Block	27
4. Veränderung der Toxizitätsausprägungen im Verlauf von Protokoll M	31
5. Einfluss der MTX-Plasmaspiegel auf die Toxizitätsausprägung	37
6. Einfluss des Single-nucleotide-Polymorphismus rs1051266 auf die Toxizitätsausprägung und MTX-Plasmaspiegel bei DS-ALL	44
Diskussion	49
Zusammenfassung	66
Literaturverzeichnis	67
Danksagung	72

Abkürzungsverzeichnis

6-MP	6-Mercaptopurin
6-TGN	6-Thioguanin-Nukleotid
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AMKL	Akute megakaryoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
CRLF2	Cytokine receptor-like factor 2
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DAMPA	2,4-Diamino-N-methylpteroic acid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Down Syndrom
DS-ALL	Down Syndrom mit akut lymphoblastischer Leukämie
EFS	Event-free survival (ereignisfreies Überleben)
GATA1	Erythroid transcription factor 1
GOT	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (AST, ASAT)
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (ALT, ALAT)
HD-MTX	Hochdosis-Methotrexat
HR	Hochrisiko
i.th.	intrathekal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
JAK2	Januskinase 2
LCV	Leucovorin
Mb	Megabasen
MR	mittleres Risiko
MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
MTX	Methotrexat
MWU	Mann-Whitney-U
NDS	Non-Down Syndrom
NDS-ALL	Non-Down Syndrom mit akut lymphoblastischer Leukämie
NFQ	Non-fluorescent quencher
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)

p.o.	per os (oral)
PCR	Polymerase chain reaction
PFS	Progressions-freies Überleben
Ref.	Referenz
RNA	Ribonukleinsäure
SLC19A1	Solute carrier 19A1
SNP	Single nucleotide polymorphism
SR	Standardrisiko
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
Tab.	Tabelle
TAM	Transiente abnormale Myelopoese
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMD	Transmembrandomäne

Einleitung

Akute lymphoblastische Leukämien im Kindes- und Jugendalter

Akute Leukämien sind mit einem Anteil von ungefähr einem Drittel die häufigsten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter (< 15 Jahre)¹. In ca. 80% der Leukämiefälle erkranken Kinder an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL). Bei der pädiatrischen ALL beträgt das mediane Erkrankungsalter ca. 4 Jahre und 8 Monate und das Verhältnis von Jungen zu Mädchen ist 1,2 zu 1¹.

Bei einer ALL nehmen die Tumorzellen ihren Ursprung aus entarteten Zellen der lymphatischen Reihe der Hämatopoese. Lymphozyten sind Zellen des adaptiven Immunsystems und werden in B-, T- und NK-Zellen unterteilt. Nach der Entstehung aus Vorläuferzellen im Knochenmark durchlaufen unreife Lymphoblasten einen komplexen Differenzierungsprozess. Je nachdem, auf welcher Stufe dieses Reifungsprozesses Vorläuferzellen entarten, exprimieren die entstandenen Leukämieblasten eine charakteristische Kombination von Markermolekülen auf der Zelloberfläche (Abb.01). Dies ermöglicht eine immunphänotypische Subklassifizierung der ALL mittels Durchflusszytometrie².

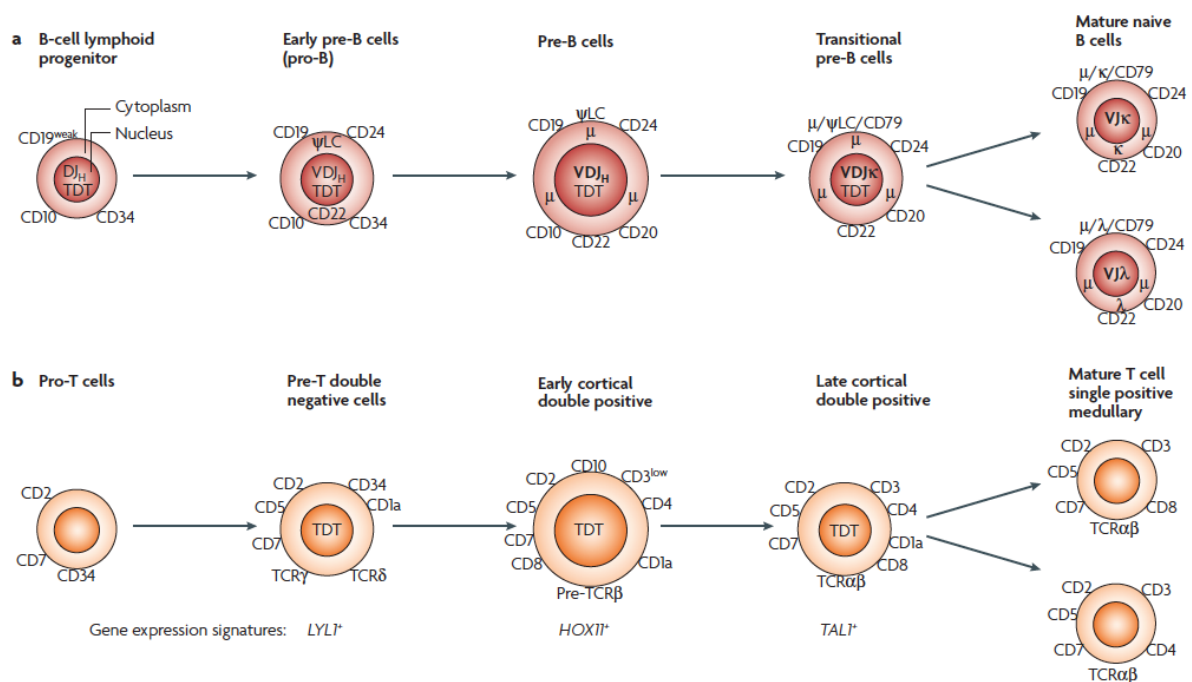


Abb.01. Schematische Darstellung der Reifung von B-Zellen (a) und T-Zellen (b). Jede Stufe exprimiert eine für sie charakteristische Kombination von Oberflächenmolekülen. Aus Ref. 104.

Eine weitere Möglichkeit zur Einteilung der ALL beruht auf zyto- und molekulargenetischen Untersuchungen (Abb.02), bei denen man spezifische chromosomale Veränderungen (z.B. Translokationen oder numerische Aberrationen, wie z.B. Trisomien) nachweist³.

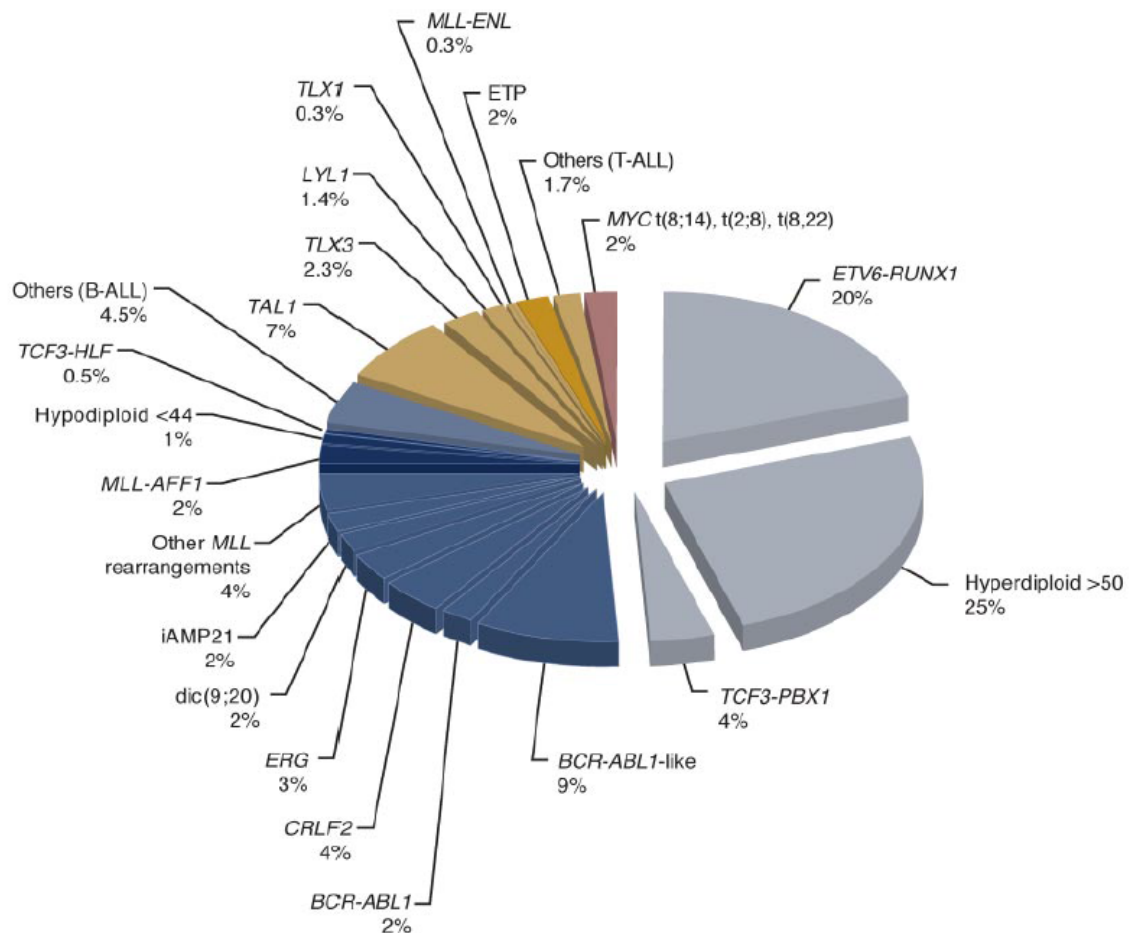


Abb.02. Häufigkeiten verschiedener genetischen Veränderungen bei pädiatrischer ALL. Aus Ref. 105.

Unter Zuhilfenahme von u.a. des Immunphänotyps und der Zytogenetik der Leukämieblasten, des Therapieansprechens sowie der Minimalen Resterkrankung (MRD) zu bestimmten Zeitpunkten anhand von patientenspezifischen Ig/TCR-Gen-Rearrangements, lassen sich Patienten in verschiedene Risikogruppen stratifizieren. Je nach Gruppe erhalten die Patienten eine risikoadaptierte Therapie. So soll vermieden werden, dass Patienten mit prognostisch günstiger ALL übertherapiert werden und unter den Nebenwirkungen und Langzeitschäden einer zu intensiven Therapie zu leiden haben. Genauso soll vermieden werden, dass Hochrisiko-Patienten, die an einer prognostisch ungünstigen Form der ALL leiden, eine

unzureichende Therapie erhalten, die nicht alle Tumorzellen abzutöten vermag. Die Prognose der pädiatrischen ALL hat sich dank zahlreichen Bemühungen und Therapieoptimierungsstudien mittlerweile deutlich verbessert: Die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate liegt nun für alle Risikogruppen zusammengenommen bei ungefähr 90%, die 5-Jahresrate für ereignisfreies Überleben bei ungefähr 80%⁴.

Therapie der pädiatrischen ALL nach dem Protokoll der internationalen, multizentrischen Therapieoptimierungsstudie AIEOP-BFM ALL 2000

Die Therapie der ALL basiert auf einer komplexen Polychemotherapie deren Ablauf und Zusammensetzung sich in den einzelnen Risikogruppen unterscheidet und gegebenenfalls in Kombination mit einer Schädelbestrahlung und/oder einer Stammzelltransplantation durchgeführt wird. Die Chemotherapie lässt sich in eine Induktions-, eine Konsolidierungs- und eine Reintensivierungsphase gliedern, an die sich eine Erhaltungstherapie anschließt. Exemplarisch sei dies hier am Protokoll der ALL-BFM 2000-Therapieoptimierungsstudie dargestellt (Abb.03).

Die knapp 5-wöchige Remissionsinduktion (Protokoll IA) zielt darauf ab eine morphologische Remission zu erreichen, d.h. der Blastenanteil im Knochenmark soll unter 5% sinken. Dazu erhalten die Patienten Kortikosteroide, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase und intrathekal den Folsäureantagonist Methotrexat (MTX). Eine Knochenmarkpunktion an Tag 33 dient der morphologischen Remissionsbeurteilung, die, wie auch die erste MRD-Messung zur Risikostratifizierung verwendet wird.

In der zweiten Phase von Protokoll I (Phase IB) wird die Remission konsolidiert, indem den Patienten Cyclophosphamid, Cytarabin, 6-Mercaptopurin (6-MP) und nochmals intrathekal MTX verabreicht wird. Am Ende dieser Therapiephase wird erneut eine Knochenmarkpunktion durchgeführt und das gewonnene Material wird gemeinsam mit dem Tag 33-Knochenmark für die Evaluierung der minimalen leukämischen Restlast verwendet. Anhand dieses Ergebnisses werden die Patienten ihrer endgültigen Risikogruppe zugeordnet.

Patienten mit schlechtem Ansprechen auf Prednison (sog. Prednison poor response) nach der achttägigen Steroidvorphase, dem Nachweis von genetischen Hochrisikokriterien wie dem *BCR-ABL*-Fusionsgen oder dem *MLL/AF4*-

Rearrangement, mit nicht vollständiger morphologischer Remission an Tag 33 oder einem hochpositiven MRD-Befund zum Zeitpunkt 2, werden zu den Hochrisiko-(HR)-Patienten gezählt. Nach Induktion und Konsolidierung erhalten diese Patienten sechs HR-Blöcke gefolgt von einer Reinduktion (Protokoll II). Die HR-Elemente sind komplexe, sehr therapieintensive Therapieblöcke bei denen eine Vielzahl verschiedener Zytostatika, wie beispielsweise Vincristin, Dexamethason, Cytarabin, Methotrexat, Cyclophosphamid und Asparaginase, zum Teil hochdosiert, verabreicht werden. Falls erforderlich, kann anschließend eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Die Patienten, die keine Stammzelltransplantation erhalten, werden im Anschluss mit einer Erhaltungstherapie (s.u.) bis zu einer Gesamtdauer der Therapie von zwei Jahren behandelt.

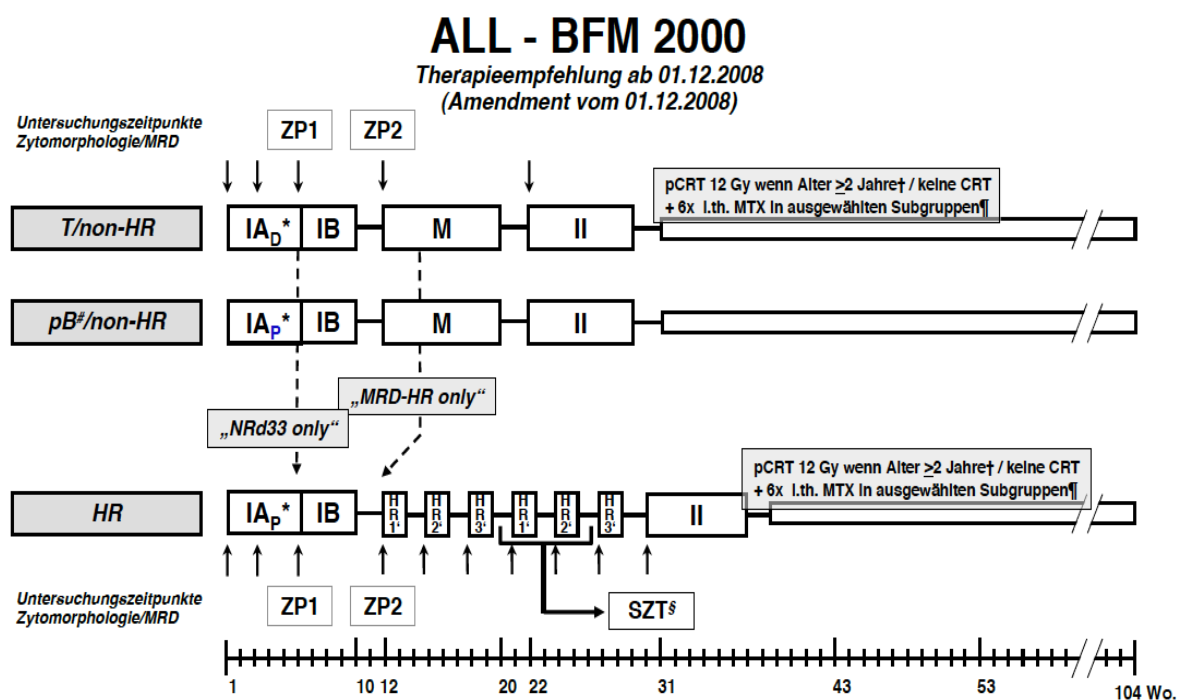


Abb.03. Übersicht über das Therapie-Protokoll der ALL-BFM 2000 Studie nach Abschluss der Randomisierungen.

Patienten mit Standardrisiko (SR) und mittlerem Risiko (MR) erhalten nach der Induktions- und Konsolidierungstherapie eine Therapiephase, die insbesondere der Extrakompartimentbehandlung dient. Dieses sog. „Protokoll M“ ist ein 8-wöchiges Therapieelement, bei dem die Patienten, neben einer täglichen 6-Mercaptopurin (6-MP) p.o. Gabe, an vier Tagen jeweils hochdosiert MTX (HD-MTX) verabreicht wird.

Dies geschieht als Infusion über 24 Stunden, zusätzlich wird MTX auch intrathekal im Rahmen einer Lumbalpunktion appliziert.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der HD-MTX-Gabe wird der MTX-Plasmaspiegel bestimmt und in Abhängigkeit von dessen Höhe ein angepasster Leucovorin-(LCV)-Rescue durchgeführt. Eine ausführlichere Beschreibung von Protokoll M findet sich im Teil „Material und Methoden“.

Nach Protokoll M erhalten die Patienten eine Reinduktionsphase (Protokoll II). Daran schließt sich die Erhaltungs- bzw. Dauertherapie mit 6-MP und MTX an. Die Therapiesteuerung geschieht anhand der während der Dauertherapie regelmäßig bestimmten Leukozytenzahlen und wird bis zu einer Gesamttherapiedauer von zwei Jahren durchgeführt.

Down Syndrom

Das menschliche Chromosom 21 kodiert trotz seiner Größe von ca. 33 Mb nur für ungefähr 300 Gene (inklusive Pseudogene)^{5,6}.

Dennoch hat eine Trisomie 21, also das Vorhandensein von drei Kopien des Chromosoms 21, umfassende Auswirkungen bei den Betroffenen zufolge. Diese klinischen und phänotypischen Veränderungen werden nach dem Erstbeschreiber J. L. Down als Down Syndrom (DS) bezeichnet⁷ und kommen mit einer Häufigkeit von ca. 1 zu 700 Lebendgeburten vor⁸. Betroffene Menschen können neben den typischen phänotypischen Stigmata wie Epikanthus medialis, Sandalenlücke und Vierfingerfurche, u.a. auch an mentaler Retardierung, angeborenen Herzfehlern, Hypothyreoidismus, Alzheimer-Krankheit, Zöliakie, Einschränkungen des Sehens und Hörens, Epilepsie und einer erhöhten Infektanfälligkeit leiden⁹.

Leukämie bei Kindern mit Down Syndrom

Interessanterweise haben Menschen mit DS ein geringeres Lebenszeitrisko an soliden Tumoren zu erkranken, jedoch haben sie im Vergleich zur euploiden Bevölkerung ein stark erhöhtes Risiko im Kindesalter eine akute Leukämie zu entwickeln¹⁰: Das Risiko an einer akuten megakaryoblastischen Leukämie (AMKL), einer seltenen Unterform der akuten myeloischen Leukämie (AML), zu erkranken, ist bei Kinder mit DS ca. 400-fach erhöht. Das Risiko für eine ALL ist ca. 20- bis 40-fach

erhöht^{11,12}. Warum das Vorhandensein einer zusätzlichen Kopie des Chromosom 21 ein höheres Leukämierisiko mit sich bringt, ist zur Zeit noch nicht gut verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass bei DS sowohl prä- als auch postnatal Störungen der Hämatopoese vorliegen. Beispielsweise scheint es bereits vor der Geburt zu einer erhöhten Anzahl von megakaryozytären-erythroiden Vorläuferzellen und zu einer gestörten B-Zell-Entwicklung in der fetalen Leber zu kommen¹³. Auch nach der Geburt gibt es Hinweise auf eine veränderte Hämatopoese und Immunzellreifung^{12,14} sowie eine verminderte Funktionstüchtigkeit und Fehlregulierungen von Lymphozyten^{15,16}.

Nahezu alle Neugeborene mit DS weisen eine erhöhte Anzahl an Leukozyten im Blut auf. Ungefähr ein Drittel von ihnen entwickelt eine transiente abnormale Myelopoese (TAM), die mit einem Blastenanteil von mehr als 20% im peripheren Blut und einer Mutation im Transkriptionsfaktor GATA1 einhergeht. In vielen Fällen verläuft sie asymptomatisch und remittiert spontan. Jedoch kann sich in ca. 5-30% der Fälle aus der TAM eine AMKL entwickeln¹².

Da diese Arbeit sich mit ALL bei Kindern mit Down Syndrom (DS-ALL) beschäftigt, soll im folgenden Abschnitt ein kurzer Überblick über die DS-ALL inklusive einiger klinischer und genetischer Merkmale und Besonderheiten gegeben werden.

Akute lymphoblastische Leukämie bei Kindern mit Down Syndrom

Aufgrund des erhöhten Risikos eine ALL zu entwickeln, stellen Patienten mit DS ca. 2-3% aller pädiatrischen ALL dar. Nahezu alle Patienten mit DS-ALL erkranken an einer B-Zell-Vorläufer-ALL. Säuglings-ALL (< 1 Jahr) und T-Zell-ALL sind sehr selten bei DS-Patienten¹⁷⁻²⁰. Im Schnitt scheinen Kinder mit DS etwas später an einer ALL zu erkranken und präsentieren sich mit einer etwas ausgeprägteren initialen Leukozytose als euploide ALL-Patienten (Non-DS-ALL, NDS-ALL)^{19,21}.

Auch zyto- und molekulargenetisch weisen DS-ALL-Blasten im Vergleich zu Leukämieblasten von euploiden Patienten einige Besonderheiten auf (Abb.04):

DS-ALL-Blasten zeigen im Karyogramm häufiger einen „normalen“ Karyotyp (d.h. 47 Chromosomen inklusive der konstitutionellen Trisomie 21) ohne erkennbare Translokationen oder weitere numerische Aberrationen im Vergleich zu NDS-ALL-Zellen (35-40% bzw. 7-21%)^{21,22}. Auch findet man signifikant seltener t(9;22) *BCR-*

ABL-, *t*(12;21) *ETV6/RUNX1*- und (11q23) *MLL*-Rearrangements bzw. Fusionsgene^{21,22}, jedoch häufiger Zugewinne von X-Chromosomen und weiteren Chromosomen 21 als dies bei NDS-ALL der Fall ist²⁰.

In ungefähr 20% der DS-ALL konnten aktivierende Mutationen der Tyrosinkinase JAK2 (v.a. an der Position R683) nachgewiesen werden. Diese können zu einer konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 und somit zu einer Zytokin-unabhängigen Proliferation führen²³⁻²⁶. Eine Dysregulation des Cytokine receptor-like factor 2 (CRLF2), eine durch Rearrangements oder Mutationen verursachte Überexpression, kann bei ca. 60% aller DS-ALL nachgewiesen werden²⁷. CRLF2 bildet mit der alpha-Untereinheit des Interleukinrezeptors-7 einen heteromeren Rezeptorkomplex für das Zytokin Thymic stromal lymphopoietin und leitet das Signal ebenfalls über JAK2 und STAT5 in den Zellkern fort. Überexpression von CRLF2 und ggf. zusätzliche JAK-Mutationen können somit die Proliferationsrate von Zellen erhöhen²⁸⁻³¹.

Da bei Patienten mit Trisomie 21 ein höheres ALL-Risiko besteht, wurden auch Gene auf Chromosom 21 hinsichtlich ihrem leukämie-auslösenden Potential untersucht. HMGN1, ein Nukleosomen-remodeling Protein und die Kinase DYRK1A, ein Zellzyklusregulator in Lymphozyten, sind vielversprechende Kandidatengene, die maßgeblich an der Entstehung einer DS-ALL beteiligt sein könnten³².

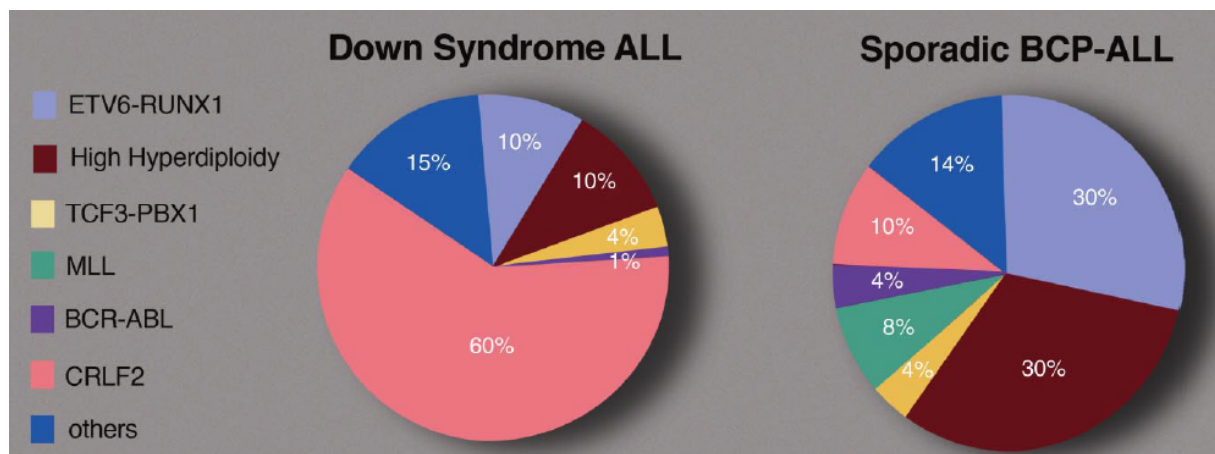


Abb.04. Übersicht über die Häufigkeiten verschiedener genetischen bzw. zytogenetischen Veränderungen bei DS-ALL und B-Zell-Vorläufer NDS-ALL. Aus Ref. 27.

Insgesamt zeigen DS-Patienten mit ALL ein schlechteres Therapieergebnis als Kinder mit NDS-ALL: Das Gesamtüberleben (overall survival, OS) bei DS-ALL wird in

der Literatur mit 61-74% angegeben. In vergleichbaren Beobachtungszeiträumen beträgt es bei NDS-ALL 77-89%. Ein ähnliches Ergebnis sieht man beim ereignisfreien Überleben (event-free survival, EFS): Die Wahrscheinlichkeit einen Zeitraum von ca. 5 bis 10 Jahren ohne Ereignis (Rezidiv, Tod in Remission, Sekundärmalignom) zu überleben beträgt bei DS-ALL 55-64%, bei NDS-ALL ist sie 68-81%^{19,33-35}. In der neueren Zeit scheinen die Überlebensraten bei DS-ALL etwas besser zu werden^{17,21}.

Für das schlechtere OS und EFS werden v.a. eine höhere Rezidiv-Rate als auch vermehrte lebensbedrohliche Komplikationen verantwortlich gemacht, die auf ausgeprägtere Chemotherapie-assoziierten Toxizitäten zurückzuführen sind^{19,21,36,37}. Dies führt häufig (d.h. in ca. 42% der Fälle) zu Dosisreduktionen während der Chemotherapie, die dann jedoch wiederum mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert sind^{19,21,35}. Dördelmann *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass DS-ALL Patienten ohne Dosisreduktion ein ähnlich gutes 6 Jahres EFS haben, wie NDS-ALL-Patienten (DS-ALL mit Reduktion 46%, DS-ALL ohne Reduktion 65%, NDS-ALL 70%)¹⁹. Vor allem das für die ALL-Therapie sehr wichtige MTX kann bei DS-ALL-Patienten durch Schleimhaut- und Organaffektion schwerste Komplikationen hervorrufen, was besonders in den HD-MTX-Therapieelementen, wie beispielsweise dem Protokoll M der BFM-ALL-Studien, zu Problemen führt – systematische Daten größerer Kohorten fehlen dazu jedoch.

Methotrexat

Der Folsäureantagonist Methotrexat (MTX) ist ein wichtiger Bestandteil der ALL-Therapie. MTX wird nach Aufnahme in die Zelle durch die Folyl-Polyglutamyl-Transferase mehrfach polyglutamiert. Dies erhöht die intrazelluläre Retention sowie die Affinität zur Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), die durch MTX in ihrer Funktion inhibiert wird^{38,39}. Dadurch kann die Zelle weniger bzw. kein Tetrahydrofolat (THF) aus Dihydrofolat (DHF) regenerieren, wodurch THF-abhängige Prozesse, wie beispielsweise die *de novo*-Synthese von Pyrimidinen und der C1-Stoffwechsel, in der Zelle zum Erliegen kommen. Verstärkt wird dies durch die ebenfalls durch Polyglutamin-MTX-vermittelte Hemmung der Thymidilat-Synthetase (Übersicht in Abb.05). Somit werden schnell proliferierende Zellen wie z.B. Lymphozyten oder auch Lymphoblasten, die stark von der Pyrimidin-*de novo*-Synthese abhängen, in ihrer Proliferation gehemmt^{40,41}.

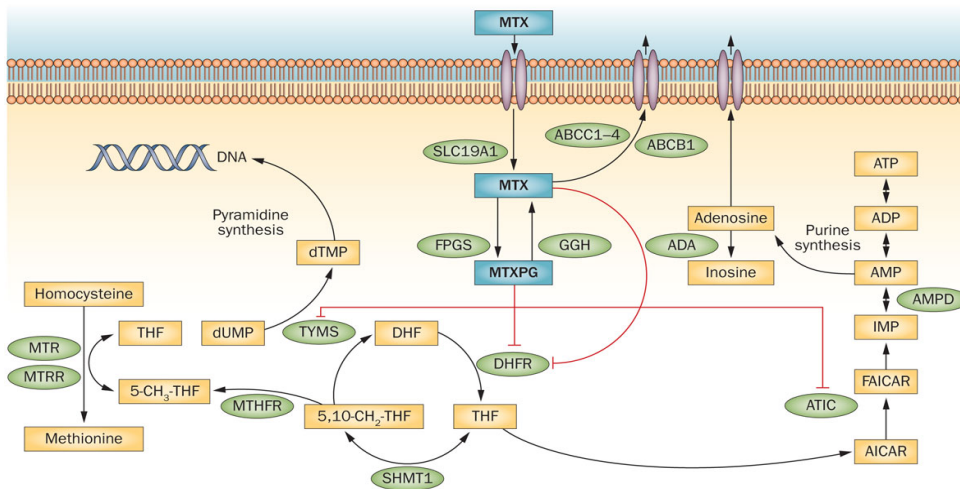


Abb.05. Übersicht über die von Methotrexat inhibierten Stoffwechselwege. Aus Ref. 41.

Methotrexat-assoziierte Toxizitäten

Jedoch hat die Hemmung der Zellteilung von schnellproliferierenden Zellen für den Patienten auch Nachteile in Form von Chemotherapie-assoziierte Toxizität: So kann MTX auch die Proliferation von nicht-leukämischen Zellen im Knochenmark hemmen und eine Knochenmarkssuppression im Sinne einer Zytopenie verursachen. Auch das Epithel des Gastrointestinaltraktes hat eine hohe Umsatzrate und kann durch MTX geschädigt werden. Klinisch kann sich dies in Form einer Mukositis mit Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen, abdominalen Krämpfen und Schmerzen, Blutungen, Gastritiden und/oder schmerzhaften Stomatitiden äußern. Des weiteren können Hepato- und Neurotoxizität unter MTX-Therapie auftreten⁴⁰. Patienten mit Down-Syndrom leiden besonders häufig an schweren MTX-assoziierten Therapieunverträglichkeiten^{19,21,36,37}.

Die o.g. Chemotherapie-assoziierten Nebenwirkungen können v.a. bei der Gabe von hochdosiertem MTX (HD-MTX, Dosis größer als 500 mg/m²) beobachtet werden⁴⁰. Glücklicherweise kann das Auftreten und die Schwere dieser Toxizitäten oft durch einen Leucovorin-Rescue (LCV-Rescue) verhindert oder zumindest abgemildert werden. Dabei verabreicht man den Patienten zeitnah (d.h. ungefähr ab 42-48h nach Start der HD-MTX-Gabe) mehrmals LCV, dessen Dosierung an die gemessenen

MTX-Plasmaspiegel adaptiert wird. Daher ist es nötig regelmäßig den MTX-Plasmaspiegel der Patienten nach einer HD-MTX-Infusion zu messen^{40,42}.

Zudem können MTX und dessen Metabolite unter sauren Bedingungen in der Niere auskristallisieren und ein akutes Nierenversagen verursachen. Dies wiederum führt zu einer verringerten MTX-Ausscheidung über den Urin und zu länger anhaltenden hohen MTX-Spiegeln im Blut⁴³. Um das Risiko für ein durch Kristallisation des MTX verursachtes Nierenversagen zu minimieren, wird im Rahmen der HD-MTX-Infusion eine Hyperhydratation sowie Alkalisierung des Harns durchgeführt. Sollte es dennoch zu einer verlängerten MTX-Exposition des Patienten durch eine unzureichende Ausscheidung kommen, kann Carboxypeptidase-G2 i.v. appliziert werden. Diese Exopeptidase spaltet Methotrexat in das inaktive Molekül DAMPA (2,4-Diamino-N-methylpteroic acid) und Glutamat. DAMPA wird dann vermutlich größtenteils biliär eliminiert und die MTX-Spiegel somit schnell gesenkt^{43,44}.

Folat-Transporter SLC19A1/RFC1

Damit MTX seine Wirkung an zellulären Enzymen entfalten kann, muss es zunächst aus dem Blut in die Zelle hineintransportiert werden. Bei dem ungefähr neutralen pH-Wert im Blut geschieht dies durch den Solute Carrier 19A1 (SLC19A1), der auch als Reduced Folate Carrier-1 (RFC1) bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um einen Folattransporter, der neben Folat-Derivaten bzw. Folat-Oxidationsstufen auch Antifolat-Metaboliten wie MTX in die Zelle transportieren kann. SLC19A1 spielt die bedeutendste Rolle beim Transport von Folat aus dem Plasma in Zellen des peripheren Gewebes und wird ubiquitär exprimiert⁴⁵. Hohe Expressionslevel sind u.a. für Plazenta, Hepatozyten, Leukozyten, Knochenmark, Gastrointestinaltrakt und Niere beschrieben worden⁴⁶. Die Bedeutung von SLC19A1 für den MTX-Transport wird dadurch unterstrichen, dass MTX-resistente Zellen häufig geringere Mengen an *SLC19A1* exprimieren oder das Transporter-Gen mutiert ist^{47,48}.

Das Gen für *SLC19A1* ist auf Chromosom 21q22.2 lokalisiert. Es besteht aus 5 kodierenden und 6 nicht-kodierenden Exons (A, A1/A2, B, C, D und E) sowie verschiedenen Promotorelementen⁴⁶. Reguliert wird die *SLC19A1*-Expression auf komplexe Art und Weise durch verschiedene Promotoren und die nicht-kodierenden Exons^{46,49}. Durch alternatives Splicing können bis zu 18 verschiedene Transkripte generiert werden. Die Transkripte *RFC-B* und *RFC-A1/A2* stellen die

Haupttranskripte in ALL-Blasten dar, *RFC-B* das Haupttranskript im Darm^{50,51}. Die Expression von *SLC19A1* wird u.a. auch von der Verfügbarkeit von Folaten reguliert: Bei moderatem Folat-Mangel wird die Expression gesteigert⁵¹, bei schwerem Mangel jedoch wieder herunterreguliert⁵².

Werden die kodierenden Exons am Ribosom translatiert, entsteht ein Transmembranprotein, das aus 591 Aminosäuren besteht und 12 Transmembrandomänen (TMD) ausbildet (Abb.06). N- und C-Terminus liegen zytoplasmatisch und im extrazellulären Loop zwischen TMD 1 und 2 befindet sich eine Glykosylierungsstelle^{53,54}. Für den Transport von Substraten scheinen v.a. die TMD 4, 5, 7, 8, 10 und 11 eine wichtige Rolle zu spielen. Der nicht-konservierte intrazelluläre Loop zwischen TMD 6 und 7, der die beiden Moleküldomänen TMD1-6 und TMD7-12 zusammen hält, ist für die Transportfunktion jedoch nicht entscheidend⁴⁵. Posttranslational bildet SLC19A1 Homooligomere. Jedes Monomer bildet zwar einen funktionellen Transporter, jedoch scheint die Oligomerisierung wichtig für das korrekte Trafficking von SLC19A1 zur Plasmamembran zu sein⁴⁵.

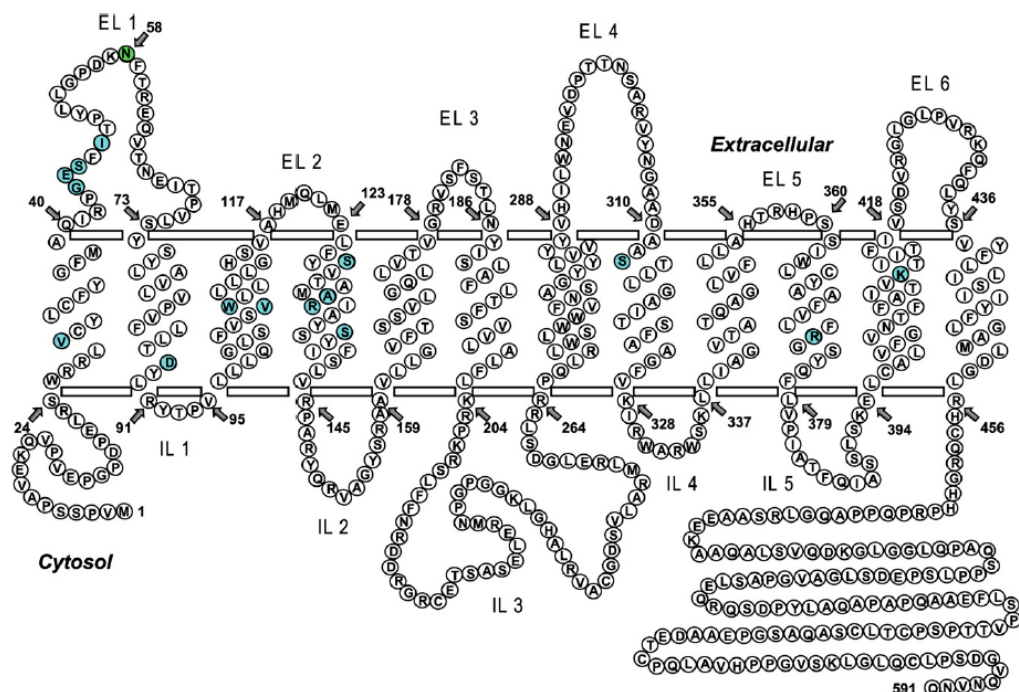


Abb.06. Model der Membrantopologie des SLC19A1-Transporters. Aus Ref. 45.

Polymorphismus G80A (rs1051266)

Wie auch bei vielen anderen Genen, finden sich im Gen von *SLC19A1* verschiedene Polymorphismen. Der Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) mit der SNP-ID rs1051266 befindet sich an Nukleotidposition 80 im zweiten kodierenden Exon des *SLC19A1*-Gen. An dieser Stelle kann entweder ein Guanosin- oder ein Adenosin-Nukleotid vorliegen (G80A bzw. 80G>A). Das G-Allel kommt weltweit im Menschen häufiger vor, als das A-Allel, dessen minor allele frequency mit ca. 44-48% beschrieben wird⁵⁵. In euploiden Populationen ergeben sich daraus ungefähr folgende Häufigkeiten der Allel-Kombinationen: GG 30%, GA 49% und AA 21%⁵⁵⁻⁵⁷. Die Variation der Basen an Position 80 bewirkt einen Aminosäureaustausch an Position 27 (Arginin zu Histidin) innerhalb der TMD 1⁵⁵. Da der Austausch einer Aminosäure innerhalb einer TMD deren Struktur, Hydrophobizität und räumliche Anordnung verändern kann, könnte sich dies auf die für den Substrat-Transport wichtigen TMDs auswirken und somit die Transportrate von *SLC19A1* beeinflussen^{58,59}. Da *SLC19A1* auch MTX über die Zellmembran transportiert, könnte dieser SNP daher einen Effekt auf die Effektivität der ALL-Therapie und die therapie-assoziierten Unverträglichkeiten haben. Baslund *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass zur Proliferation stimulierte B-Zellen von euploiden Probanden mit AA-Allelkombination signifikant mehr fluoreszenzmarkiertes MTX aufnehmen konnten, als Zellen mit der GG-Kombination⁵⁸. Zudem konnte gezeigt werden, dass pädiatrische ALL-Patienten mit der AA-Variante eine doppelt so hohe Chance haben in Remission zu bleiben⁶⁰. Auch bei Erwachsenen mit malignen Erkrankungen wurde ein Vorteil der AA-Variante bezüglich des Progressions-freien Überlebens (PFS) und OS beschrieben⁶¹. Andere Studien konnten keine Unterschiede in den Transportraten der beiden Varianten zeigen⁵⁹ oder sahen gar ein schlechteres Outcome bei Kindern mit NDS-ALL und der AA-Variante⁶². Auch zum Einfluss des G80A-SNP auf MTX-assoziierte Toxizitäten gibt es unterschiedliche Ergebnisse⁶⁰⁻⁶⁴.

Ziel dieser Arbeit

Kinder mit DS und ALL leiden häufig an starken MTX-assoziierten Nebenwirkungen während der Chemotherapie, systematische Daten in größeren Kohorten weitgehend uniform behandelter Kinder mit DS-ALL fehlen jedoch bislang. Diese Arbeit soll daher dazu beitragen, diese MTX-assoziierte Toxizität bei DS-ALL besser zu verstehen,

und, wenn möglich, Faktoren zu identifizieren, die eine Vorhersage über die zu erwartende Therapieverträglichkeit ermöglichen.

Dazu werden zunächst die MTX-assoziierten Toxizitäten und die daraus möglicherweise resultierenden Dosisanpassungen bei 103 DS-ALL-Patienten anhand der Therapie- und Toxizitätsdokumentation des HD-MTX-Elements Protokoll M der ALL-BFM Studien der Jahre 1995, 2000 und 2009 deskriptiv ausgewertet und mit einer Kohorte von 1109 Non-Down-Syndrom-Patienten verglichen. Es soll auch untersucht werden, wie stark die Toxizitäten ausgeprägt waren, wenn DS-ALL-Patienten eine hohe oder eine – wie mittlerweile empfohlen – um 90% reduzierte MTX-Anfangsdosis erhielten. Zudem sollen die MTX-Plasmaspiegel zu den Zeitpunkten 42 h und 48 h nach Start der MTX-Gabe ausgewertet und mit der aufgetretenen Toxizitätsstärke in Verbindung gesetzt werden.

Im Hinblick auf die Toxizitätsausprägung im Rahmen der MTX-Therapie gibt es interessanterweise einige DS-ALL Patienten, die die Behandlung relativ nebenwirkungsarm überstehen und somit die Normaldosis von 5000 mg/m² vertragen könnten, während andere bereits bei einer niedrigen MTX-Dosis an starker Therapie-assoziiierter Mukositis leiden (Persönliche Kommunikation K. Bleckmann, A. Möricke und G. Cario, sowie Ref. 37). Daher soll untersucht werden, ob MTX-Dosissteigerungen bei DS-ALL-Patienten, die zunächst eine niedrige MTX-Dosis bekamen und diese ohne starke Nebenwirkungen überstanden, bezüglich der untersuchten Toxizitäten sicher und verträglich sind.

Eine mögliche Erklärung für die o.g. Diskrepanz innerhalb der DS-ALL-Kohorte könnte der Single Nucleotide Polymorphismus rs1051266 des *SLC19A1*-Gens liefern, der möglicherweise mit veränderten Transportraten für MTX einhergeht. Bei einem Down Syndrom liegt das Chromosom 21-kodierte *SLC19A1*-Gen in allen Körperzellen in dreifacher Ausführung vor und wird, im Vergleich zu euploiden Zellen, stärker exprimiert⁶⁵. Daher könnten auch bereits geringe, durch den SNP bedingte Unterschiede in der MTX-Transportrate zu unterschiedlich großen MTX-Mengen führen, die in die Körperzellen aufgenommen werden. Dies könnte schließlich zu unterschiedlichen Toxizitätsausprägungen bei verschiedenen Allel-Kombinationen führen. Ein möglicher Zusammenhang der vier möglichen Allel-Kombinationen (AAA, GAA, GGA und GGG) bei Trisomie 21 mit der Ausprägung der MTX-assoziierten Toxizität wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wird

die Allel-Kombination der DS-ALL Patienten mittels eines TaqMan-basierten Allelic Discrimination Assays bestimmt und die Allel-Kombination mit den beobachteten Toxizitätsstärken und MTX-Plasmaspiegeln in Korrelation gesetzt.

Material und Methoden

Patientenkohorte

Grundlage für diese Studie bildete eine pädiatrische DS-ALL-Kohorte mit insgesamt 103 DS-ALL-Patienten aus drei aufeinanderfolgenden Therapiestudien: 19 Patienten aus der ALL-BFM 95-Studie, 50 aus der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie und 34 aus der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie. Als Kontroll-Kohorte dienten 489 NDS-ALL-Patienten aus der AIEOP-BFM ALL 2000-Studie, sowie 620 NDS-ALL-Patienten aus der ALL-BFM 95-Studie (insgesamt 1109 NDS-ALL-Patienten). Für diese Studien einschließlich der studienassoziierten Begleitforschung liegt jeweils ein zustimmendes Ethikvotum der entsprechenden Ethikkommission vor:

ALL-BFM 95: Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover, Nr. 1170, Zustimmung erteilt am 21.06.1995

AIEOP-BFM ALL 2000: Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover, Nr. 2522, Zustimmung erteilt am 09.11.2000

AIEOP-BFM ALL 2009: Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, EudraCT-Nr. 2007-004270-43, AZ.: A 177/09, Zustimmung erteilt am 12.03.2010

Zudem liegt von jedem in die Analysen eingeschlossenen Patienten bzw. dessen Sorgeberechtigten das schriftliche Einverständnis zur Verwendung der Daten und gelagerten Proben für wissenschaftliche Fragestellungen vor.

Eingeschlossen wurden nur ALL-Patienten, die entsprechend ihrer Risikogruppe Protokoll M erhalten haben und bei denen die Therapiedokumentation für Protokoll M vollständig vorhanden und die Toxizitätsdokumentation möglichst vollständig vorhanden war. Patienten mit einem Diagnosealter von < 1 Jahr oder > 18 Jahre wurden nicht berücksichtigt.

Therapieelement Protokoll M

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Toxizitäten im HD-MTX-Therapieelement Protokoll M und im Besonderen auf die erste der vier HD-MTX-Gaben gelegt. Patienten mit Standardrisiko (SR) und mittlerem Risiko (MR) erhielten nach der Induktions- und Konsolidierungsphase das Protokoll M. In diesem 8-wöchigen

Therapieelement wird den Patienten, neben einer täglichen 6-MP p.o. Gabe von 25 mg/m², an den Tagen 8, 22, 36 und 50 jeweils hochdosiertes MTX als intravenöse Infusion über 24 Stunden verabreicht, zusätzlich auch intrathekal im Rahmen einer Lumbalpunktion (Abb.07). Bei i.v. Applikation von HD-MTX beträgt die Dosis 5000 mg/m² pro Gabe, wobei 10% der Gesamtdosis als Ladungsdosis in den ersten 30 Minuten verabreicht werden, die restlichen 90% als Dauerinfusion über die folgenden 23,5 Stunden. Die MTX-Dosis für die intrathekale Gabe richtet sich nach dem Alter des Patienten (Alter 1 Jahr: 8 mg; Alter 2 Jahre: 10 mg; Alter 3 Jahre oder älter: 12 mg). Im Normalfall wird 24, 36, 42 und 48 Stunden nach Start der HD-MTX-Gabe der MTX-Serumspiegel gemessen und in Abhängigkeit von der Höhe des MTX-Spiegels ein angepasster Leucovorin-(Folinsäure)-Rescue durchgeführt (Leucovorin-Dosis im Normalfall mit 15 mg/m²). Sollte der MTX-Spiegel zu hoch sein, wird ein LCV-Rescue mit entsprechend höherer LCV-Dosis durchgeführt und die Diurese forciert.

Für Patienten der ALL-BFM 95-Studie bestand zum Randomisierungszeitpunkt R1 die Möglichkeit entweder in das reguläre Protokoll M oder in das modifizierte Protokoll MCA randomisiert zu werden. Der Ablauf von Protokoll MCA gleicht dem von Protokoll M, jedoch wird hier zusätzlich an den Tagen 9, 23, 37 und 51 jeweils eine Cytarabin-Infusion (200 mg/m²) über 24 Stunden verabreicht.

ALL-BFM 2000: Protokoll M

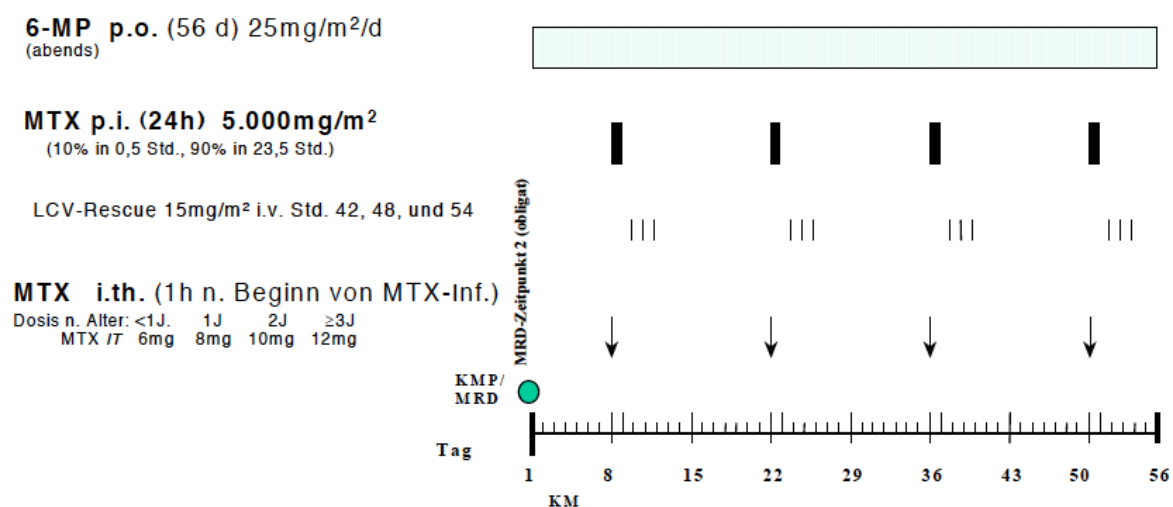


Abb.07. Übersicht über Protokoll M der ALL-BFM 2000-Studie.

Toxizitäten, MTX-Plasmaspiegel und Dokumentation

In den Studien ALL-BFM 95 und 2000 wurden die Patienten nach jedem HD-MTX-Block untersucht sowie Blutparameter und etwaig aufgetretene Toxizitäten anhand eines standardisierten Fragebogens dokumentiert (ALL-BFM 95: „Akut-Toxizität während/nach folgendem ALL-BFM 95 Therapieelement“, Anhang 5 des ALL-BFM-95-Studienprotokolls bzw. ALL-BFM 2000: „Akut-Toxizität während und nach ALL-BFM 2000“, Anhang 3.3 des ALL-BFM-2000-Studienprotokolls). Zudem wurde der MTX-Spiegel zu verschiedenen Zeitpunkten, sowie der LCV-Rescue dokumentiert. Die MTX-Spiegelbestimmung erfolgte in den jeweiligen Studienkliniken nach der vor Ort üblichen Standardmethode.

Die in dieser Arbeit berücksichtigten Toxizitäten umfassen die Leukozytenzahl und Thrombozytenzahl im Blut (als Marker für die Knochenmarkfunktion), den Infektionsstatus, das Vorliegen einer Stomatitis (als Marker für Mukositis), die Leberenzyme GOT und GPT sowie Serum-Bilirubin (als Marker für die Leberfunktion) und Kreatinin im Serum (als Marker für die Nierenfunktion).

Die Ausprägung der Toxizitäten wurde entsprechend der Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE 2.0) in 5 Graduierungen beurteilt. Grad 0 beschreibt das Nichtvorhandensein einer Toxizität, Grad 1 bis 4 beschreiben die Ausprägungsstärken einer Toxizität (Grad 4 repräsentiert die größtmögliche Toxizitätsausprägung). Dokumentiert wurde jeweils die stärkste Toxizitätsausprägung, die entweder anhand von Blutwerten oder bei der klinischen Untersuchung im Zeitraum zwischen letzter und nächster HD-MTX-Gabe festgestellt wurde. Einen Überblick über die Einteilung und Voraussetzungen für die Einordnung in die 5 Toxizitätsgrade gibt Tab.01.

Toxizitätsdokumentationsbögen in dieser Form existierten für die AIEOP-BFM ALL 2009-Studie nicht. Daher wurden Studienkliniken, die DS-ALL-Patienten im Rahmen dieser Studie behandelten einzeln angeschrieben und gebeten retrospektiv anhand der dortigen Patientenakten die 7 Toxizitäten analog zu den beiden Vorgängerstudien im 5-Grade-System zu beurteilen. Zudem sollten auch die MTX-Spiegel für die Stunde 42 und 48 nach Start der MTX-Gabe angegeben werden. Insgesamt wurden von den verschickten Fragebögen 34 vollständig ausgefüllt und zurückgeschickt, so dass 34 DS-ALL-Patienten der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie in dieser Arbeit mit ausgewertet werden konnten.

Grade	Leuko- zyten**	Thrombo- zyten**	Infektion	Stomatitis	GOT/GPT	Kreatinin	Bilirubin
0	$\geq 4,0$	≥ 100	keine	keine	N***	N	N
1	3,0 - <4,0	75 - <100	leicht	schmerzlose Ulzera, Erythem	$>N - 2,5 \times N$	$>N - 1,5 \times N$	$>N - 1,5 \times N$
2	2,0 - <3,0	50 - <75	kein Erreger, i.v.-AB	schmerzende Ulzera, kann essen	$>2,5 - 5,0 \times N$	$>1,5 - 3,0 \times N$	$>1,5 - 3,0 \times N$
3	1,0 - <2,0	10 - <50	Erreger, i.v.-AB	schmerzende Ulzera, kann nicht essen	$>5 - 20 \times N$	$>3 - 6 \times N$	$>3 - 10 \times N$
4	<1,0	<10	septischer Schock	TPN* wg. Stomatitis erforderlich	$>20 \times N$	$>6 \times N$	$>10 \times N$

Tab.01. Toxizitäten und Schweregrade gemäß CTCAE 2.0. *TPN: totalparenterale Ernährung;
in Gpt/l; *N: Altersnorm

Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der IBM SPSS-Software Version 22 durchgeführt. Für Vergleiche von verschiedenen Gruppen in Kreuztabellen wurde der Chi²-Test (für berechnete Erwartungswerte ≥ 5) bzw. der Fisher's exact-Test (für berechnete Erwartungswerte < 5) verwendet. Beim Vergleich von unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test (MWU, auch „Wilcoxon-Rangsummen-Test“). Verbundene Stichproben mit mindestens ordinal-skalierten Variablen wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Test getestet. Als Test auf Normalverteilung der MTX-Plasmaspiegel wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. p-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Nachkommastellen wurden kaufmännisch gerundet.

Patientenmaterial DNA

Die Untersuchung des *SCL19A1* G80A Polymorphismus (rs1051266) bei DS-ALL wurde mittels eines TaqMan-basierten Allelic discrimination assays durchgeführt. Da diese Technik auf einer PCR-Methode basiert, wurde als Template Patienten-DNA benötigt. Da hier ein Wirtsfaktor (und kein Leukämiezell-spezifischer Faktor) untersucht werden sollte, wurde, sofern möglich, DNA aus Remissionsproben

verwendet. Je nach Verfügbarkeit wurden Patientenproben (DNA aus Knochenmark oder peripherem Blut) vom Tag der Diagnosestellung bis zum Zeitpunkt kurz vor Protokoll M genutzt.

DNA von ALL-BFM 2000-Patienten und AIEOP-BFM ALL 2009-Patienten

Die DNA der DS-ALL-Patienten aus den ALL-BFM 2000 und 2009-Studien wurde dem DNA-Archiv der Studiengruppe entnommen. Die DNA wurde entsprechend der Labor-Standardmethode isoliert, präpariert (QIAamp DNA Blood Midikit, Qiagen) und bei -20°C gelagert.

DNA von ALL-BFM 95-Patienten

DNA der DS-ALL-Patienten aus der ALL-BFM 95-Studie wurde nicht wie bei den späteren Studien archiviert und musste zum Teil von Blut- oder Knochenmarkausstrichen präpariert werden (8 Patienten) oder wurde zum Teil von M. Stanulla (MHH, Hannover) freundlicherweise zur Verfügung gestellt, da sie im Rahmen einer früheren Publikation bereits isoliert wurde (10 Patienten, Ref. 66). Die DNA-Isolation von den relativ alten Blut- und Knochenmarkausstrichen wurde mit einer Magnet-Bead-basierten Technik durchgeführt (ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit, Fa. Invitrogen, siehe unten).

DNA Isolation von Ausstrichen mittels ChargeSwitch Kit

DNA von Blut- bzw. Knochenmarkausstrichen der Patienten wurde mit Hilfe des ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit (Invitrogen) entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt, jedoch mit leichten Modifikationen: Pro Probe wurde 1 ml Lysis Buffer mit 10 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Tube (Eppendorf) gemischt. Aus dieser Lösung wurden ca. 20 µl auf den Objektträger mit dem Blut- bzw. Knochenmarkausstrich gegeben und mit der Pipettenspitze verteilt. Nach einer kurzen Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden wurden die Zellen des Ausstriches vorsichtig mit einer gelben Pipettenspitze abgeschabt, in das vorbereitete Tube mit Lysis Buffer und Proteinase K gegeben und gründlich gevortext. Danach wurde die Probe für 60 Minuten in einem Wärmeblock bei 55°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben dreimal zwischendurch gevortext. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 5 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Tube überführt und das Pellet verworfen. Zum Überstand wurden 200 µl Purification

Buffer und 20 µl ChargeSwitch Magnetic Beads gegeben und durch auf- und abpipettieren miteinander vermischt. Diese Lösung wurde eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Proben in einen magnetischen Tube-Ständer (MagnaRack, Invitrogen) gestellt wurde. Die aus den lysierten Zellen freigesetzte DNA wurde an die Magnetbeads gebunden, welche sich durch das Magnetfeld des Tube-Ständers an einer Stelle der Wand des Tubes sammelten und festgehalten wurden. Nun wurde der Überstand entfernt und das Tube aus dem magnetischen Ständer genommen werden. Die Probe wurde durch Zugabe von 500 µl Wash Buffer und darauffolgendes auf- und abpipettieren gewaschen und wieder in das MagnaRack gestellt. Nachdem sich die DNA-beladenen Magnetbeads wieder in der Nähe des Magneten gesammelt hatten, wurde der Wash Buffer abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Zum Eluieren der DNA von den Beads wurde die Probe aus dem Magnetständer entnommen mit 100 µl Elution Buffer versetzt und ca. 10-mal auf- und abpipettiert um alle Magnetbeads zu resuspendieren. Dann wurden die Proben für 5 Minuten bei 55°C auf dem Heizblock inkubiert, um die DNA von den Beads zu lösen. Schließlich wurden die Tubes ein letztes Mal in den magnetischen Tube-Ständer gestellt um die leeren Beads an der Wand des Tubes zu sammeln. Der DNA-haltige Überstand konnte dann vorsichtig in ein neues 1,5 ml Tube überführt und weiterverwendet werden.

Allelic discrimination assay

Für die Untersuchung des *SCL19A1* G80A Polymorphismus (rs1051266) bei DS-ALL-Patienten wurde ein TaqMan-basierter Allelic discrimination assay der Firma Applied Biosystems durchgeführt (Custom TaqMan SNP Genotyping Assay mit Assay ID „AHUAP0W“). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der spezifischen Bindung einer fluoreszenzmarkierten Sonde an die komplementäre DNA Sequenz, die den zu untersuchenden SNP enthält und einer Polymerase Chain Reaction (PCR), deren Primer vor bzw. hinter dem SNP liegen. Während der Elongationsphase der PCR trifft somit die TaqMan-Polymerase auf die an ihre spezifische Sequenz gebundene Sonde. Durch die Exonukleaseaktivität der TaqMan-Polymerase wird die Sonde degradiert und daraufhin der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Je nach Sonde/Allel ist dies entweder der Farbstoff „VIC“ oder „FAM“. Der freie Farbstoff kann nun, nach entsprechender Anregung, fluoreszieren und die Fluoreszenz gemessen werden. Im kovalent an die Sonde

gebundenen Zustand konnte der Fluoreszenzfarbstoff dies nicht, da die Sonde einen sog. Non-Fluorescent-Quencher (NFQ) enthält, der die Fluoreszenz des Farbstoffes trotz adäquater Anregung unterdrückt.

Die Sequenzen der im Assay verwendeten Primer und fluoreszenzmarkierten Sonden sind folgende:

<i>Primer/Sonde</i>	<i>Modifikation</i>	<i>Sequenz 5' -> 3'</i>
Forward	keine	GCCTGACCCCGAGCTC
Reverse	keine	CATGAAGCCGTAGAAGCAAAGGTA
Sonde 1 (A-Allel)	VIC/NFQ	ACACGAAGGT <u>T</u> GCCGCC
Sonde 2 (G-Allel)	FAM/NFQ	ACGAGG <u>C</u> GCCGCC

Die unterstrichenen Nukleotide in den Sequenzen der Sonden 1 und 2 binden an den SNP rs1051266.

Für den Allelic discrimination Assay wurde die isolierte DNA mittels TE-Puffer (Sigma-Aldrich) auf eine Konzentration von 1,5 ng/µl verdünnt. Pro Reaktionsansatz wurden 12,5 µl TaqMan Mastermix (TaqMan 2x Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems), 1,25 µl des 20x SNP Genotyping Assays (s.o.) und 11,25 µl DNA (ca. 17 ng DNA bei DNA-Konzentration von 1,5 ng/µl) zu einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Reaktion zusammen pipettiert. Jede Patienten-DNA wurde in Triplikaten vorbereitet. Die Messungen sowie die PCR-Reaktionen wurden mit einem ABI 7900HT Fast Realtime-PCR System (Applied Biosystems) auf 96-well-Platten durchgeführt. Zunächst wurde die Hintergrundfluoreszenz gemessen, dann das PCR-Programm durchlaufen (Standard-Modus, initial 10 min bei 95°C, dann 15 s bei 92°C gefolgt von 1 min bei 60°C; die letzten beiden Schritte werden 40x wiederholt). Schließlich wurde eine Endpunktmessung der Fluoreszenz vorgenommen und mit der Hintergrundfluoreszenz verrechnet. Die Auswertung erfolgte anhand eines Allelic discrimination plots.

Allelinformationen für die 107 bereits genotypisierten NDS-ALL-Patienten, die als Kontrollgruppe dienten, wurden freundlicherweise von S. Radtke zur Verfügung gestellt (Ref. 67).

Ergebnisse

1. Patientenkohorte

Für diese Studie wurden Patientendaten von pädiatrischen ALL-Patienten ausgewertet, die im Zeitraum von 1995 bis 2016 an einer der drei ALL-BFM-Studien (1995/2000/2009) teilnahmen, zwischen ≥ 1 Jahr und < 18 Jahre alt waren und entsprechend ihrer Risikostratifizierung das Hochdosis-MTX-Protokoll M (bzw. MCA bei einigen der ALL-BFM 95-Patienten) verabreicht bekamen. Die Therapiedokumentation von Protokoll M musste vorhanden und die Toxizitätsdokumentation sollte möglichst vollständig sein. Von den insgesamt 1212 eingeschlossenen Patienten waren 103 DS-ALL (8,5%) und 1109 NDS-ALL (91,5%) (Abb.08).

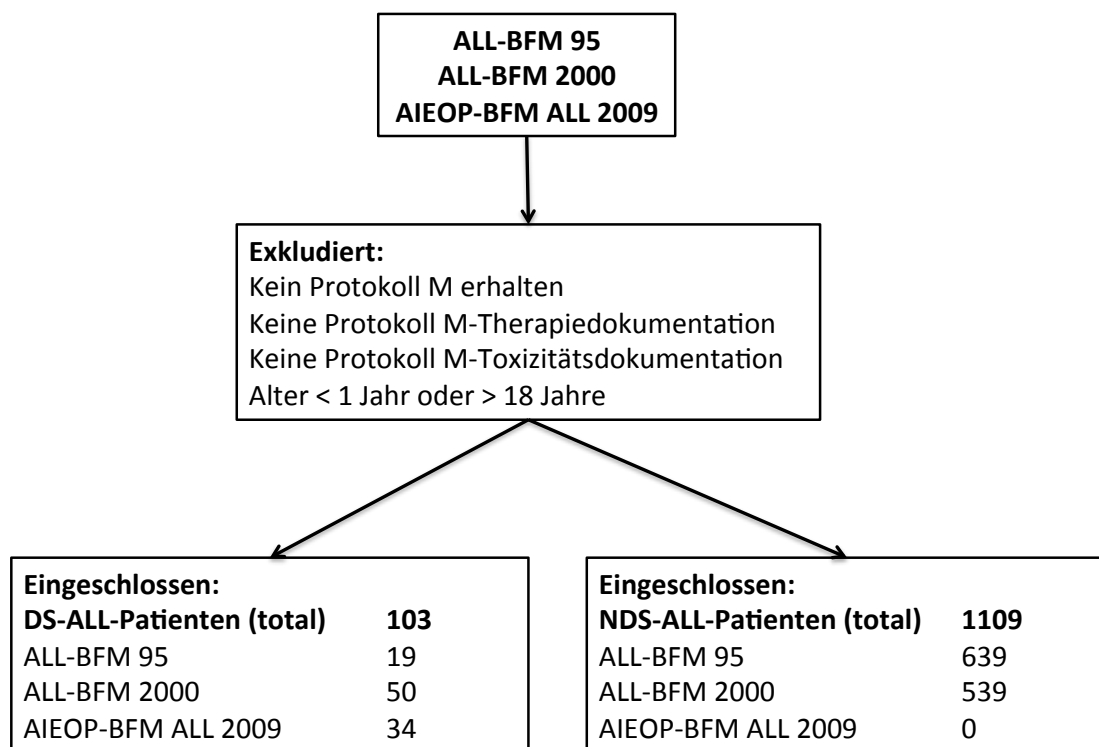


Abb.08. Übersicht über die Anzahl der ein- bzw. ausgeschlossenen Patienten entsprechend der Einschlusskriterien dieser Studie.

Das mediane Erkrankungsalter unterschied sich zwischen den beiden Patientengruppen nicht signifikant (DS-ALL: 4 Jahre 9 Monate, NDS-ALL: 5 Jahre 11 Monate, n.s., $p=.564$). Auch keine signifikanten Unterschiede wurden bei der Geschlechterverteilung festgestellt (Anteil männliches Geschlecht: DS-ALL: 62,1%, NDS-ALL: 54,0%, n.s., $p=.113$). Die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Diagnose unterschied sich nicht zwischen DS-ALL und NDS-ALL, jedoch zeigten DS-ALL signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen als NDS-ALL ($p=.029$). Die mediane Anzahl der Leukämieblasten im Knochenmark bei Diagnosestellung unterschied sich wiederum nicht zwischen DS und NDS (92% vs. 94%, n.s., $p=.118$).

Alle berücksichtigten DS-ALL waren B-Zell-Leukämien, bei den NDS-ALL-Patienten war ca. 1/8 an einer T-Zell-Leukämie erkrankt ($p<.001$). Immunphänotypisch dominierte bei beiden Kohorten die common-B-ALL (DS-ALL: 76,2%, NDS-ALL: 74,6%). Zytogenetische Informationen standen nur teilweise zur Verfügung (DS: $n=55/103$, NDS: $n=215/1109$). Dennoch zeigte sich deutlich ein Vorherrschen des unauffälligen Karyotyps bei DS-ALL-Patienten im Vergleich zu NDS-ALL (50,9% vs. 28,4%, $p=.002$), wobei „unauffälligem Karyotyp“ bei DS eine Trisomie 21 und bei NDS ein euploider Chromosomensatz jeweils ohne weitere zytogentische Veränderungen zu verstehen ist. Hyperploide Chromosomensätze mit > 50 Chromosomen waren signifikant häufiger bei NDS-ALL als bei DS-ALL zu finden (28,8% vs. 9,1%, $p=.002$). Auch das durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bzw. PCR untersuchte Rearrangement *ETV6-RUNX1* bzw. *TEL-AML1* konnte bei NDS-ALL signifikant häufiger gefunden werden (25,3% vs. 7,6%, $p<.001$). Das *BCR-ABL*-Rearrangement hingegen konnte bei keinem der eingeschlossenen Patienten nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der Patientendaten zeigt Tab.02.

	DS (n=103)		NDS (n=1109)		
Charakteristika	n=	Ergebnis	n=	Ergebnis	p=
Alter (Median)	103/103	4 Jahre 9 Monate (1J. 2M. – 17J. 8M.)	1109/1109	5 Jahre 11 Monate (1J. 0M. – 18J. 0M.)	$p=.564^*$
Geschlecht					$p=.113^{**}$
- männlich	64/103	62,1%	599/1109	54,0%	
- weiblich	39/103	37,9%	510/1109	46,0%	
Leukozyten initial					$p=.411^*$
- Median	102/103	9.850/ μ l (870 – 205.000)	1109/1109	10.700/ μ l (100 – 686.000)	
- < 10.000/ μ l	55/102	53,9%	544/1109	49,1%	
- 10.000 – 49.999/ μ l	37/102	36,3%	364/1109	32,8%	
- > 50.000/ μ l	10/102	9,8%	201/1109	18,1%	
Zelltyp der ALL	101/103		1070/1109		$p<.001^{**}$
- B-Zell-ALL	101/101	100%	937/1070	87,6%	
- T-Zell-ALL	0/101	0%	133/1070	12,4%	
Zytogenetik	55/103		215/1109		$p=.002^{**}$
- normaler Karyotyp	28/55	50,9%	61/215	28,4%	
- Hyperploid > 50 Chr.	5/55	9,1%	62/215	28,8%	$p=.002^{**}$
Rearrangements	92/103		810/1109		$p<.001^{**}$
- <i>ETV6-RUNX1</i>	7/92	7,6%	205/810	25,3%	
- <i>BCR-ABL</i>	0/92	0%	0/810	0%	

Tab.02. Übersicht der Patientencharakteristika. * = getestet mittels Mann-Whitney-U-Test, ** = getestet mittels χ^2 -Test. Als statistisch signifikant wurden $p \leq .05$ erachtet.

2. Verabreichte MTX-Dosis und Dosisveränderungen in Protokoll M

Von 103 DS-ALL-Patienten durchliefen 95 (92,2%) Protokoll M/MCA vollständig. Die restlichen 8 Patienten wurden entweder im Verlauf von Protokoll M aufgrund eines unzureichenden Therapieansprechens in die HR-Gruppe eingeordnet (n= 4), brachen Protokoll M aufgrund von zu hoher Toxizität oder Komplikationen ab (n= 2) oder verstarben in Protokoll M (n= 1, verstarben im Rahmen eines septischen Schocks aufgrund schwerer Pneumonie bei ausgeprägter Neutropenie und Mukositis). Bei einem DS-ALL-Patienten war die Therapiedokumentation nicht bis zum Ende von Protokoll M vollständig vorhanden. Protokoll M starteten 98 DS-ALL (95,1%), Protokoll MCA nur 5 Patienten (4,9%).

Von den 1109 NDS-ALL-Patienten bekamen 1080 (97,4%) Protokoll M/MCA komplett verabreicht. Die Patienten, die das HD-MTX-Protokollelement nicht

vollständig erhielten, wurden im Verlauf in die HR-Gruppe eingestuft (n= 24), brachen das Therapieelement wegen Toxizität oder Komplikationen ab (n= 2) oder hatten eine nicht vollständige Therapiedokumentation (n= 3) (siehe Abb.09). Es starteten 890 NDS-ALL-Patienten mit Protokoll M (80,3%) und 219 (19,7%) mit Protokoll MCA. Für die weitere Auswertung werden – sofern nicht anders angegeben – Protokoll M und Protokoll MCA gemeinsam als „Protokoll M“ bezeichnet/betrachtet. Insgesamt wurden 4777 HD-MTX-Gaben in den Blöcken 1 bis 4 ausgewertet. Davon wurden 396 an DS-ALL- und 4381 an NDS-ALL-Patienten verabreicht.

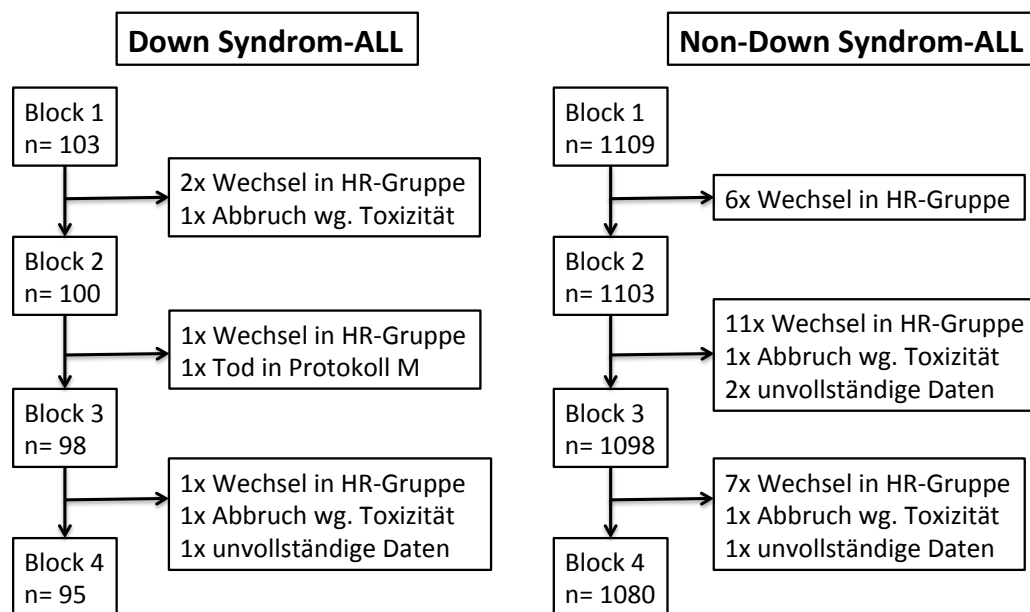


Abb.09. Übersicht über die Patientenzahlen in den jeweiligen HD-MTX-Blöcken von Protokoll M. Angaben für DS-ALL links, für NDS-ALL rechts.

Um die Dosisveränderungen im Verlauf von Protokoll M – auch für den einzelnen Patienten – übersichtlicher zu machen, wurden die verabreichten MTX-Dosen anhand ihres Betrages (in mg/m^2) in vier Kategorien eingeteilt: **H** (high, $\geq 4500 \text{ mg}/\text{m}^2$, entspricht der empfohlenen Normaldosis von $5000 \text{ mg}/\text{m}^2 \pm 10\%$), **M** (medium, $4499 - 551 \text{ mg}/\text{m}^2$, entspricht einer intermediären Dosis zwischen der empfohlene Normaldosis und der empfohlenen reduzierten Dosis), **L** (low, $\leq 550 \text{ mg}/\text{m}^2$, entspricht der empfohlenen reduzierten Dosis von $500 \text{ mg}/\text{m}^2 \pm 10\%$) und **0** (Null, $0 \text{ mg}/\text{m}^2$, stellvertretend für beispielsweise einen Abbruch oder das Auslassen eines HD-MTX-Blockes) (siehe auch Tab.03).

Kategorie	Beschreibung	MTX-Dosis
H	high / hoch	5000 mg/m ² ±10%
M	medium / mittel	zwischen 551 – 4499 mg/m ²
L	low / niedrig	500 mg/m ² ±10%
0	keine Gabe von MTX	0 mg/m ²

Tab.03. Einteilung der verabreichten MTX-Dosis.

Die Einteilung der verabreichten MTX-Dosierungen der einzelnen Blöcke erlaubt es die Dosisverläufe über Protokoll M genauer zu betrachten. Jedem Patienten kann anhand der verabreichten Dosis für jeden Block eine der Kategorien H, M, L oder 0 zugeordnet werden. Diese können zu einer von vier Buchstabenkombinationen zusammengefasst werden, die den individuellen Verlauf der MTX-Dosierungen in Protokoll M widerspiegelt. Wenn ein Patient beispielsweise die Kombination „HHML“ aufweist, bedeutet dies, dass er in den Blöcken 1 und 2 jeweils eine hohe, in Block 3 eine mittlere und in Block 4 eine niedrige MTX-Dosis erhielt und somit im Verlauf von Protokoll M insgesamt in der Dosis reduziert wurde.

Die Vierbuchstabenkombination ermöglicht es nun, die MTX-Dosisverläufe für Protokoll M für DS-ALL- und NDS-ALL-Patienten in vereinfachter Form zu vergleichen, nachdem man die Buchstabenkombinationen wiederum in folgende Gruppen zusammenfasst:

- „HHHH“: Patient erhält durchgehend die hohe MTX-Dosis über alle 4 Blöcke
- „Hred“: Patient startet Prot. M mit hoher Dosis, wird aber im Verlauf reduziert
- „MMMM“: Patient erhält durchgehend eine mittlere Dosis
- „Lsteig“: Patient startet mit niedriger Dosis, erfährt im Verlauf eine Steigerung
- „LLLL“: Patient erhält durchgehend die niedrige MTX-Dosis über alle 4 Blöcke

Wie in Tab.04 zu sehen, sind die Dosisverläufe bei NDS-ALL sehr homogen, fast alle Patienten erhielten in allen vier Blöcken eine hohe MTX-Dosis (94,6%). Keiner der NDS-ALL-Patienten startete Protokoll M mit einer geringen Dosis. Bei DS-ALL hingegen sind die Verläufe sehr heterogen: Knapp ein Viertel der Patienten erhielt durchgehend eine hohe MTX-Dosis. Ein Teil der Patienten wurde im Verlauf reduziert, ungefähr doppelt so viele starteten mit einer niedrigen Dosis und wurden im Verlauf gesteigert. Schließlich erhielten 18,4% eine durchgehend niedrige Dosis.

Die Verläufe „HHHH“ und „Hred“ fanden sich v.a. bei DS-ALL aus dem Zeitraum 1995 – 2003 (nicht gezeigt). Im Jahre 2004 gab die Studienleitung der ALL-BFM-Studien die Empfehlung, dass aufgrund der problematischen Verträglichkeit von HD-MTX ALL-Patienten mit Down Syndrom in Protokoll M zunächst eine niedrige Startdosis erhalten sollen und bei akzeptabler Toxizitätsausprägung in folgenden Blöcken in der MTX-Dosis gesteigert werden können. Somit finden sich ab 2004 überwiegend die Verläufe „Lsteig“ und „LLLL“ (nicht gezeigt).

	DS-ALL (n= 103)		NDS-ALL (n= 1109)	
Vereinfachter Verlauf	n=*	%*	n=*	%*
HHHH	25/103	24,3%	1049/1109	94,6%
Hred	16/103	15,5%	14/1109	1,3%
MMMM	6/103	5,8%	19/1109	1,7%
Lsteig	31/103	30,1%	0/1109	0%
LLLL	19/103	18,4%	0/1109	0%

Tab.04. Vereinfachte Dosisverläufe für DS-ALL und NDS-ALL in Protokoll M. *Die Differenz zu Gesamtzahl bzw. zu 100% ergibt sich aus Patienten, die für diese Einteilung nicht berücksichtigt wurden. Exkludiert wurden Patienten, die in ein HR-Schema wechselten, die während Protokoll M verstarben oder bei denen es Unstimmigkeiten bei der Dokumentation gab. Bei DS-ALL betraf dies 6 Patienten (5,8%), bei NDS-ALL 27 (2,4%).

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die MTX-Dosisverläufe in Protokoll M bei DS-ALL sehr heterogen sind – also u.a. auch Dosisreduktionen oder -steigerungen beinhalten – und im Vergleich dazu, die Verläufe bei NDS-ALL sehr homogen sind – nahezu alle NDS-Patienten erhielten durchgehend die volle MTX-Dosis im Konsolidierungselement Protokoll M.

3. Untersuchung der Toxizitätsausprägungen nach dem ersten HD-MTX-Block

3.a) Vergleich zwischen DS-ALL und NDS-ALL

Um die unterschiedliche Ausprägung der Toxizitäten, sowohl bei NDS im Vergleich zu DS, als auch innerhalb der DS-Kohorte, besser verstehen zu können, wurde sich zunächst auf die aufgetretenen Toxizitäten nach Block 1 beschränkt, da hier der geringere Bias erwartet wurde. Die Toxizitätsdokumentation war für Block 1 bei DS-ALL im Schnitt zu 95%, bei NDS-ALL zu 87% vollständig vorhanden.

Zunächst wurde die Häufigkeiten an Grad 3 und 4 Toxizitäten betrachtet (Tab.05).

Block1 Toxizität	DS (n=103) Grad 3 und 4		NDS (n=1109) Grad 3 und 4		p=
	n=*	%	n=*	%	
Leukozyten	33/100	43%	261/980	26,6%	<i>p</i> =.108
Thrombozyten	25/99	25,3%	89/976	9,1%	<i>p</i> <.001
Infektion	7/97	7,2%	15/958	1,6%	<i>p</i> =.002
Stomatitis	30/98	30,6%	56/970	5,8%	<i>p</i> <.001
Leberenzyme	16/97	16,5%	61/964	6,3%	<i>p</i> =.001
Kreatinin	0/99	0%	0/963	0%	<i>n.a.</i>
Bilirubin	1/98	1,0%	47/932	5,0%	<i>p</i> =.078

Tab.05. Grad 3 und 4 Toxizitäten nach Block 1 bei DS-ALL und NDS-ALL. *Nicht bei allen Patienten standen die Informationen für alle untersuchten Toxizitäten zur Verfügung, daher im Nenner Abweichungen zur Gesamtpatientenzahl der entsprechenden Kohorte. n.a., nicht anwendbar. Als statistisch signifikant wurden $p \leq .05$ erachtet. p-Werte wurden ermittelt nach Fisher' exact-Test.

ALL-Patienten mit Down Syndrom litten in Block 1 signifikant häufiger an Grad 3 und 4 Toxizitäten. DS-ALL-Patienten zeigten signifikant häufiger hochgradige Thrombozytopenien, Infektionen, Stomatitiden, sowie Transaminasenerhöhungen ($p < .001$, $p = .002$, $p < .001$ und $p = .001$, siehe auch Abb.10A).

Da hier alle DS-ALL-Patienten unabhängig von ihrer applizierten MTX-Dosis betrachtet wurden, sollen der Vergleichbarkeit halber nun die Toxizitäten von ALL-Patienten ausgewertet werden, die in Block 1 eine hohe Dosis (Dosis H) erhielten (DS-ALL: $n = 45/103$, NDS: $n = 1089/1109$; siehe Abb.10B).

Grad 3 und 4 Toxizitäten nach MTX-Block 1

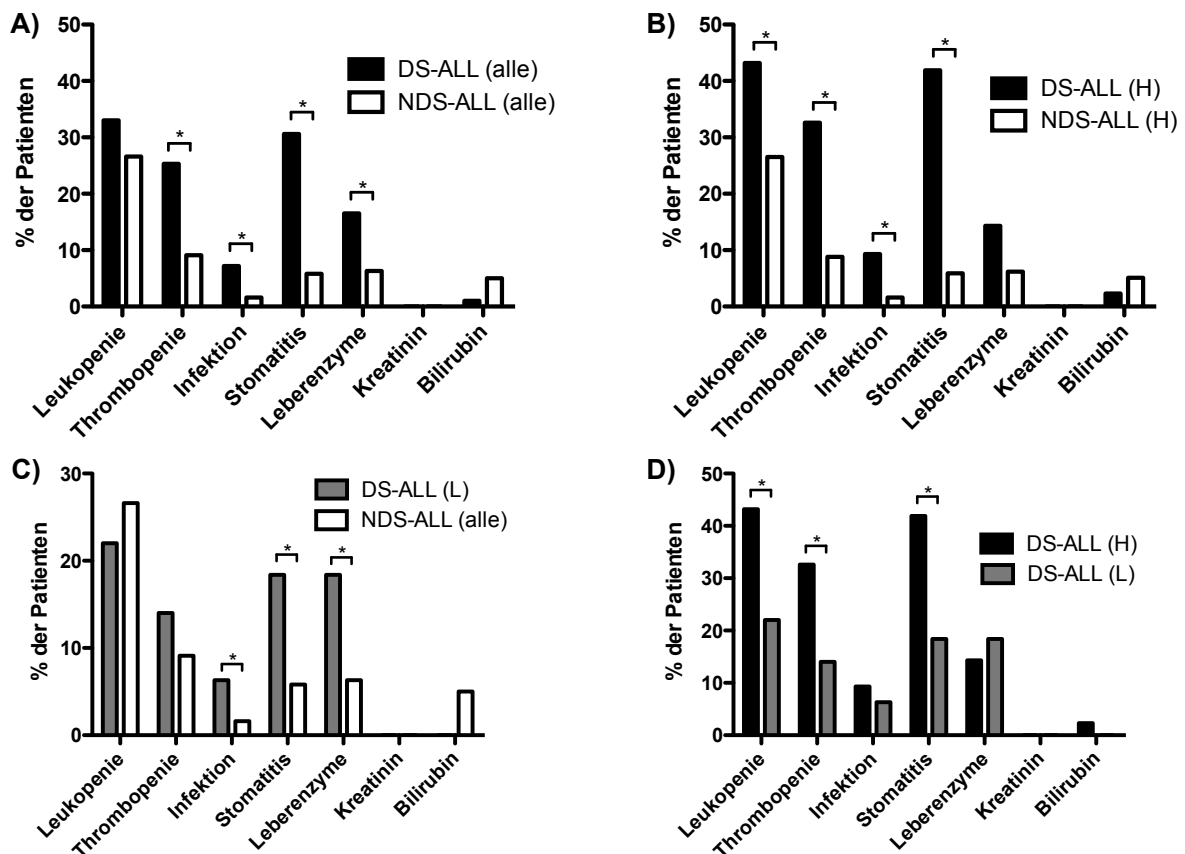


Abb.10. Prozentuale Häufigkeit der Grad 3 und 4 Toxizitäten bei DS- und NDS-ALL-Patienten nach Gabe der jeweils angegebenen MTX-Dosis nach Block 1.

A) Vergleich zwischen DS-ALL und NDS-ALL (jeweils sämtliche MTX-Dosierungen).

B) Vergleich zwischen DS-ALL und NDS-ALL (jeweils nur Dosis H).

C) Vergleich zwischen DS-ALL (Dosis L) mit NDS-ALL (alle Dosierungen).

D) Vergleich von DS-ALL mit hoher (H) und niedriger (L) MTX-Dosis (H: Dosis H, L: Dosis L).

MTX-Dosierungen: Dosis H: 5000 mg/m², Dosis M: 551 – 4499 mg/m², Dosis L: 500 mg/m². *p ≤ .05 nach Fisher's exact-Test.

DS-ALL zeigten nach Gabe einer hohen MTX-Dosis im Vergleich zur NDS-ALL-Gruppe signifikant häufiger Grad 3 und 4 Leukopenien, Thrombopenien, Infektionen, Stomatitiden sowie Lebertransaminasenerhöhung (p=.023, p<.001, p=.002, p<.001 und p=.001).

Um schwere Toxizitätsausprägungen zu vermeiden, wurden 51/103 DS-ALL-Patienten in Block 1 mit einer niedrigen MTX-Dosis (Dosis L) behandelt. Daher wurde nun geprüft, wie sich die Toxizität bei diesen Patienten im Vergleich zu NDS-ALL-Patienten verhält. Da kein NDS-Patient die MTX-Dosis L verabreicht bekam,

wurden DS-ALL (Dosis L) mit allen NDS-ALL-Patienten (Dosis H und Dosis M) verglichen (Abb.10C).

ALL-Patienten mit Down Syndrom hatten nach Block 1 – trotz niedriger MTX-Dosis – signifikant häufiger Grad 3 und 4 Infektionen, Stomatitiden und Lebertransaminasenerhöhungen als NDS-ALL-Patienten, die eine hohe oder mittelhohe MTX-Dosis verabreicht bekamen ($p=.050$, $p=.003$ und $p=.005$). Bezüglich des Auftretens von schweren Leukopenien und Thrombopenien unterschieden sich die beiden Gruppen nicht.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass Kinder mit DS-ALL deutlich häufiger schwere Toxizitäten nach MTX-Gabe in Protokoll M zeigten als NDS-ALL-Patienten. Dies lässt sich nicht nur dann beobachten, wenn sie eine (gleich-)hohe MTX-Dosis (Dosis H) wie NDS-ALL-Patienten erhielten, sondern auch, wenn eine um 90% erniedrigte Dosis (Dosis L) verabreicht wurde. Besonders betroffen waren davon die Toxizitäten Infektionen, Stomatitiden sowie Leberenzym erhöhungen.

3.b) Vergleich von DS-ALL mit hoher und niedriger MTX-Dosis

Da DS-ALL-Patienten sowohl mit hoher als auch mit niedriger MTX-Dosis stärkere Toxizitäten erleiden als euploide ALL-Patienten, soll nun untersucht werden, ob sich die beiden DS-ALL-Gruppen mit unterschiedlicher Dosierung bezüglich der Toxizitätsausprägung unterscheiden (Abb.10D).

Eine niedrige MTX-Dosis ließ DS-ALL-Patienten signifikant weniger häufig an schweren Grad 3 und 4 Leukopenien, Thrombopenien und Stomatitiden leiden ($p=.045$, $p=.046$, und $p=.021$). Kein Unterschied war hingegen bei der Häufigkeit des Auftretens von Grad 3 und 4 Infektionen, Leberenzym- und Bilirubinerhöhungen feststellbar.

Unter Berücksichtigung der obigen Toxizitätsbeobachtungen lässt sich zusammenfassen, dass DS-ALL-Patienten im ersten Block von Protokoll M häufiger an schwereren MTX-assoziierten Toxizitäten litten als NDS-ALL-Patienten. Betroffene Toxizitäten waren v.a. Thrombozytopenien, Infektionen, Stomatitiden und Lebertransaminasenerhöhungen. Auch DS-ALL-Patienten, die eine um 90%

niedrigere MTX-Dosis erhielten, zeigten signifikant häufiger schwere Toxizitätsausprägungen im Vergleich zu NDS-ALL. Jedoch im Vergleich zu DS-ALL-Patienten, die die volle/hohe MTX-Dosis bekamen, wies die Niedrigdosisgruppe signifikant weniger Leukopenien, Thrombopenien und Stomatitiden auf.

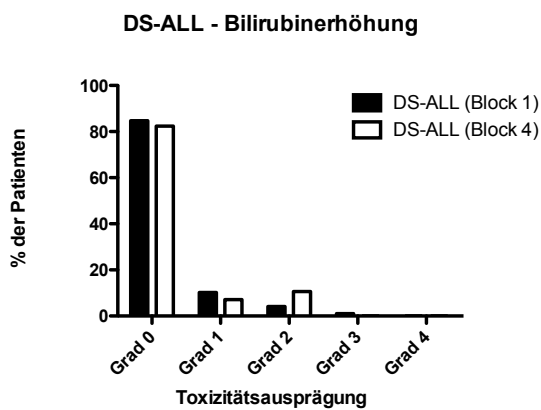
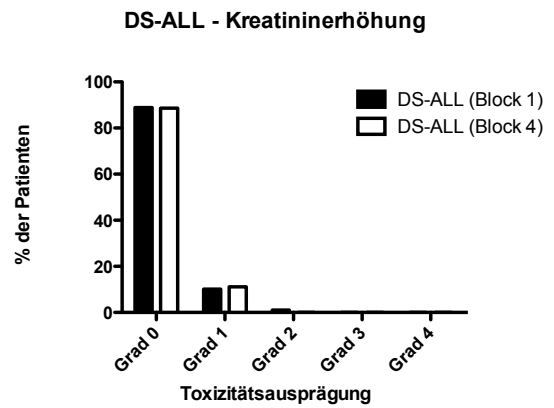
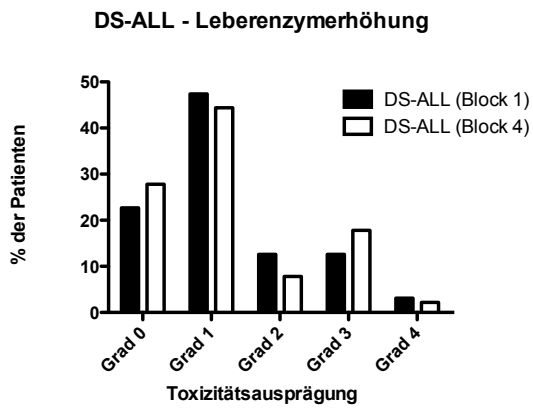
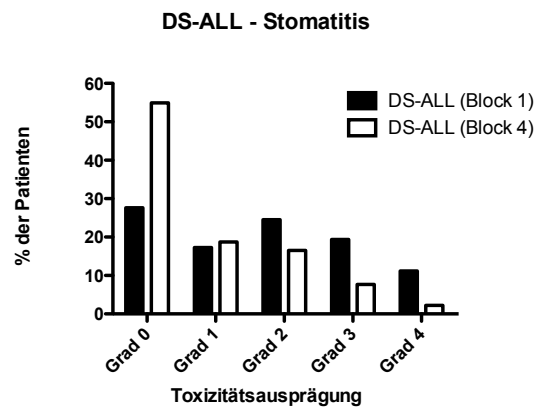
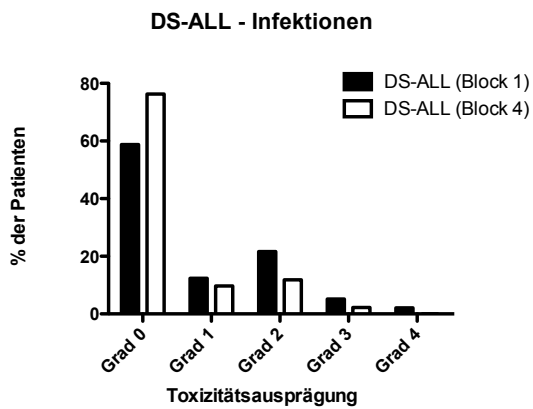
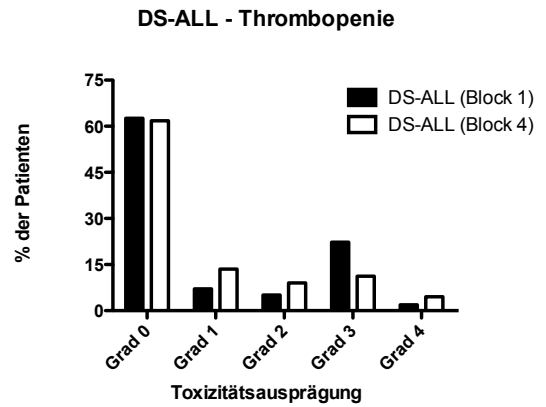
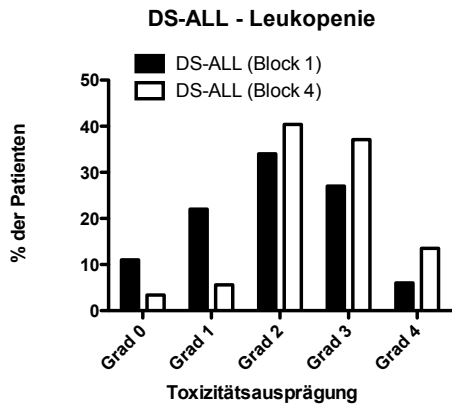
4. Veränderung der Toxizitätsausprägungen im Verlauf von Protokoll M

4.a) Vergleich von Block 1 mit Block 4

Im Verlauf von Protokoll M erhalten ALL-Patienten insgesamt vier Gaben von HD-MTX im Abstand von je zwei Wochen. Nach jedem Block wird die maximale Toxizitätsausprägung bestimmt und dokumentiert. Dies ermöglicht es – gerade auch im Hinblick auf die Dosisanpassungen bei DS-ALL – die unterschiedlichen Toxizitätsausprägungen im Verlauf zu beschreiben und zu vergleichen.

Zunächst wurde die Häufigkeit der verschiedenen Schweregrade der einzelnen Toxizitäten jeweils für Block 1 und Block 4 bei DS-ALL gegenübergestellt (Abb.11).

Abb.11. (nächste Seite): Häufigkeiten der Toxizitätsschweregrade bei DS-ALL nach Block 1 im Vergleich zu Block 4. Berücksichtigt wurden alle MTX-Dosierungen (Dosis H, M und L). Der Wilcoxon-Vorzeichen-Test ergab signifikante Unterschiede zwischen Block 1 und 4 bei Leukopenien, Infektionen und Stomatitiden ($p \leq .05$).



DS-ALL-Patienten zeigten im Verlauf von Protokoll M beim Vergleich von Block 1 mit Block 4 signifikante Abnahmen der Toxizitätsniveaus bei Infektionen und Stomatitiden ($p=.021$ bzw. $p<.001$), wohingegen der Schweregrad der Leukopenie in Block 4 zunahm ($p<.001$). Keine Unterschiede wurden bei den Schweregraden von Thrombozytopenien, Leberenzym-, Kreatinin- oder Bilirubinerhöhungen beobachtet. Miteinbezogen wurden hier alle an DS-ALL-Patienten verabreichte MTX-Dosierungen der entsprechenden Blöcke, so dass auch die Dosisanpassungen mitberücksichtigt wurden.

Ein ähnliches Bild zeigt sich beim analogen Vergleich der Toxizitäten von Block 1 mit 4 bei NDS-ALL-Patienten (Abb.12). Dort war ebenfalls eine signifikante Abnahme der Infekt- und Stomatitis-Toxizität zu beobachten ($p=.034$ bzw. $p<.001$). Jedoch im Vergleich zu Block 1, stieg in Block 4 nicht nur der Schweregrad an Leukopenien, auch eine höhere Lebertoxizität war im Verlauf beobachtbar ($p<.001$ bzw. $p=.021$). Bezüglich Thrombopenien, Kreatinin- und Bilirubinerhöhungen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (nicht gezeigt). Einen Überblick über die Statistik gibt Tab.08.

Vergleich der Toxizitätsausprägung	DS-ALL Block 1 → Block 4		NDS-ALL Block 1 → Block 4	
	p=*	Ausprägung	p=*	Ausprägung
Leukozytopenie	$p<.001$	Block 1 < Block 4	$p<.001$	Block 1 < Block 4
Thrombopenie	$p=.642$	Block 1 = Block 4	$p=.950$	Block 1 = Block 4
Infektion	$p=.021$	Block 1 > Block 4	$p=.034$	Block 1 > Block 4
Stomatitis	$p<.001$	Block 1 > Block 4	$p<.001$	Block 1 > Block 4
Leberenzyme	$p=.514$	Block 1 = Block 4	$p=.021$	Block 1 < Block 4
Kreatinin	$p=.763$	Block 1 = Block 4	$p=.782$	Block 1 = Block 4
Bilirubin	$p=.180$	Block 1 = Block 4	$p=.452$	Block 1 = Block 4

Tab.08. Statistik zum Vergleich der Toxizitätsschweregrade bei DS- und NDS-ALL nach Block 1 und Block 4. *Als signifikant gewertet wurden p-Werte $\leq .05$ nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Test.

Toxizitätsausprägungen bei NDS-ALL nach MTX-Block 1 und 4

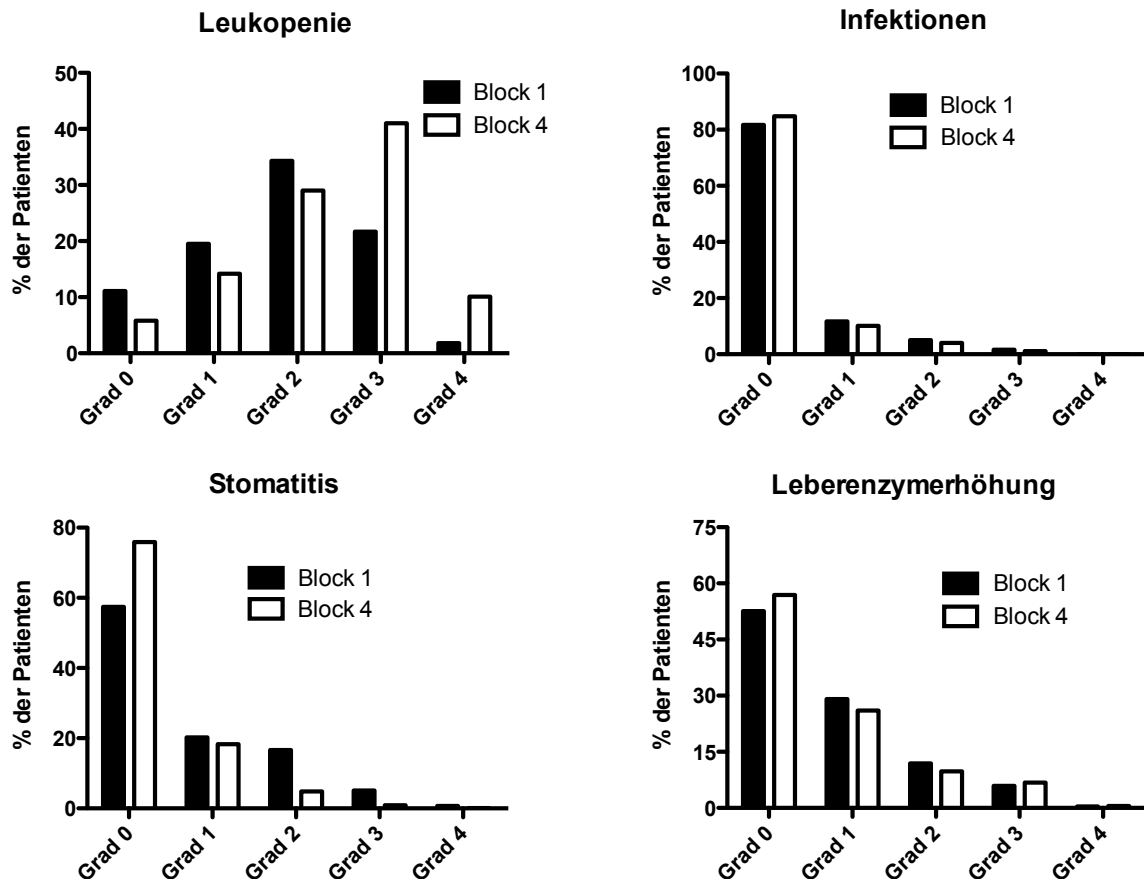


Abb.12: Häufigkeiten der Toxizitätsschweregrade bei NDS-ALL nach Block 1 im Vergleich zu Block 4. Berücksichtigt wurden alle MTX-Dosierungen (Dosis H und M). Der Wilcoxon-Vorzeichen-Test ergab signifikante Unterschiede zwischen Block 1 und 4 bei Leukopenien, Infektionen, Stomatitiden und Leberenzymserhöhungen ($p \leq .05$).

Vergleicht man die Toxizitäten zwischen DS- und NDS-Patienten nach Block 4, so kann man signifikant häufiger Grad 3 und 4 Thrombopenien (DS-ALL: 15,7% vs. NDS-ALL: 7,7%, $p = .007$), Stomatitiden (DS-ALL: 9,9% vs. NDS-ALL: 1,0%, $p < .001$) und Lebertransaminasenerhöhungen (DS-ALL: 20,0% vs. NDS-ALL: 7,4%, $p < .001$) bei DS-ALL-Patienten feststellen. Bilirubin hingegen war bei NDS-Patienten erhöht (Grad 3 und 4: DS-ALL: 0% vs. NDS-ALL: 4,9%, $p = .027$). Bezüglich Grad 3 und 4 Leukopenien (DS-ALL: 50,6% vs. NDS-ALL: 51,0%) und Infektionen (DS-ALL: 2,2% vs. NDS-ALL: 1,1%) gab es interessanterweise keinen Unterschied mehr zwischen DS- und NDS-ALL-Patienten.

4.b) Vergleich von Block 1 mit Block 2

Die erste Dosisanpassung bei DS-ALL-Patienten kann bei der MTX-Gabe im Rahmen von Block 2 stattfinden. Patienten, die in Block 1 eine niedrige Dosis erhielten und diese gut vertragen haben, können nach Empfehlung der ALL-BFM-Studienkoordination im darauffolgenden Block eine gesteigerte MTX-Dosis erhalten. DS-ALL-Patienten, die eine hohe Dosis in Block 1 erhielten und unter ausgeprägter Toxizität litten, erhielten in Block 2 eine reduzierte MTX-Dosis. Nun soll untersucht werden, ob eine Dosissteigerung von Block 1 auf Block 2 verträglich ist, d.h. nicht zu einer gefährlichen Steigerung an Toxizitätsausprägungen führt, sowie, ob eine Dosisreduktion zu einer ausreichenden Abmilderung von Toxizitäten führt.

Zunächst wurde untersucht, ob es nach Dosissteigerung zu einem vermehrten Auftreten von höhergradigen Toxizitäten kam. Von den 51 DS-ALL-Patienten, denen in Block 1 die niedrige MTX-Dosis L verabreicht wurde, bekamen 28 Patienten in Block zwei eine gesteigerte MTX-Dosis. Die Dosis in Block 2 entsprach in allen 28 Fällen einer Dosis der Kategorie M (Dosis M: zwischen 4499 – 551 mg/m²). Die mediane MTX-Dosis von Block 2 betrug bei dieser Subgruppe 1000 mg/m² (Range: 943,4 mg/m² bis 2056 mg/m²), somit wurde die Dosis von Block 1 auf Block 2 bei diesen Patienten ungefähr verdoppelt.

Zwischen den Toxizitätsniveaus von Block 1 und Block 2 konnte bei keiner der untersuchten Toxizitäten ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (beispielhaft dargestellt für Infektionen und Stomatitiden in Abb.13A, alle Ergebnisse tabellarisch in Tab.09). Lediglich ein Trend zum häufigerem Auftreten von höhergradigen Leukopenien in Block 2 konnte beobachtet werden (nicht gezeigt; n.s., p=.068).

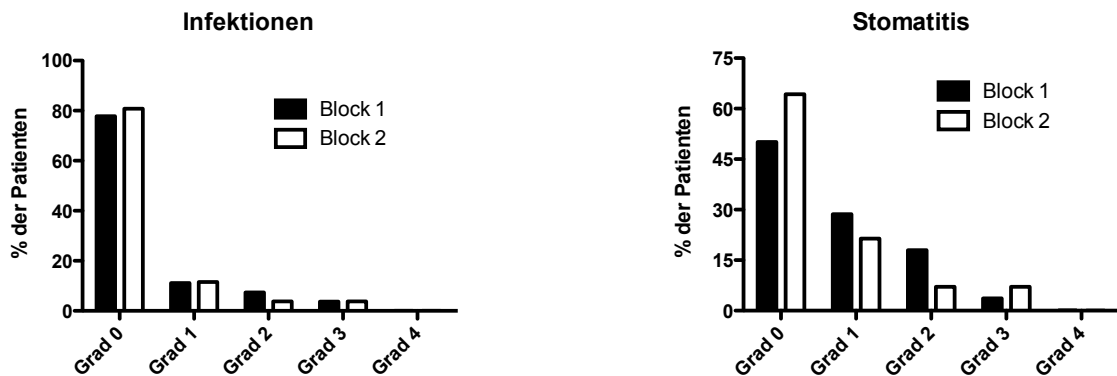
Abb.13. (nächste Seite): Häufigkeiten der Toxizitätsschweregrade der Toxizitäten Infektion und Stomatitis nach Block 1 im Vergleich zu Block 2 bei DS-ALL.

A) DS-ALL-Patienten, die nach initial niedriger MTX-Dosis im ersten Block im zweiten Block eine gesteigerte Dosis erhielten. Berücksichtigt wurden alle DS-ALL mit MTX-Dosierung L in Block 1 und Dosis M oder H in Block (n= 28, davon wurden alle Patienten von Dosis L auf Dosis M gesteigert). Der Wilcoxon-Vorzeichen-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Block 1 und 2.

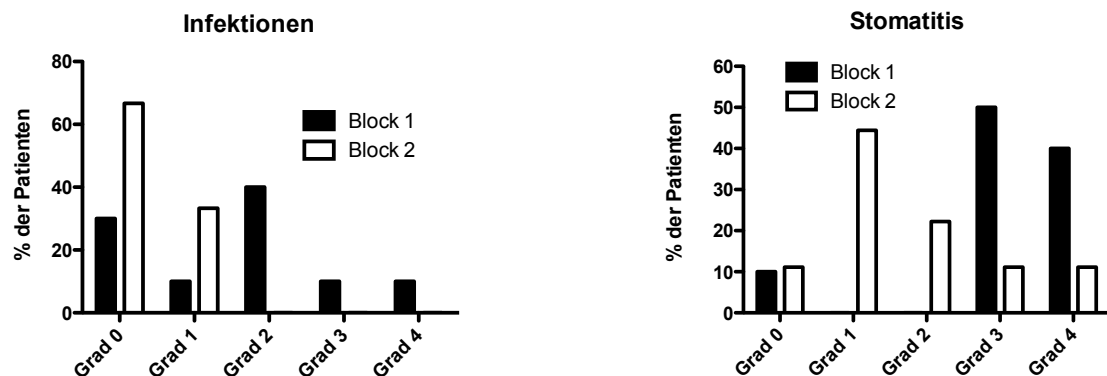
B) DS-ALL-Patienten, die nach zunächst hoher MTX-Dosis im ersten Block im zweiten Block in der Dosis reduziert wurden. Berücksichtigt wurden alle DS-ALL mit MTX-Dosierung H in Block 1 und Dosis M, L oder 0 in Block 2. Signifikante Unterschiede konnten bei Stomatitiden und Infektionen beobachtet werden (p=.016 bzw. p=.031). p-Werte ≤.05 nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Test wurden als signifikant gewertet.

MTX-Dosierungen: Dosis H: 5000 mg/m², Dosis M: 551 – 4499 mg/m², Dosis L: 500 mg/m².

A) Toxizitätsausprägungen bei DS-ALL mit Dosissteigerung



B) Toxizitätsausprägung bei DS-ALL mit Dosisreduktion



Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Dosisreduktion in Block 2 bei DS-ALL-Patienten, die eine hohe MTX-Dosis in Block 1 erhielten und unter schweren Toxizitäten zu leiden hatten, zur Abmilderung der Nebenwirkungen nach Block 2 führte. Von den 45 DS-ALL-Patienten, die in Block 1 eine hohe MTX-Dosis erhielten, wurden 10 Patienten bezüglich der Dosis reduziert, davon 7-mal auf Dosis M (Mediane MTX-Dosis in Block 2: 2250 mg/m², Range: 1000 mg/m² bis 3348 mg/m²), 2-mal auf Dosis L (Median: 499 mg/m², Range: 492 mg/m² bis 507 mg/m²) und einmal wurde Protokoll M aufgrund von schwerer Toxizität abgebrochen (Dosis 0). Die Häufigkeiten der einzelnen Schweregrade sind in Abb.13B dargestellt. Die Block 2-Toxizitäten des Therapieabbrechers wurden dort nicht berücksichtigt.

Trotz der geringen Fallzahlen konnte nach Dosisreduktion eine signifikante Abnahme an schweren Stomatitiden und Infektionen beobachtet werden (p=.016 bzw. p=.031). Die Häufigkeitsverteilungen der restlichen Toxizitäten lassen zumindest eine Tendenz zur reduzierten Ausprägung in Block 2 erkennen, auch wenn diese nicht statistisch signifikant war. Einen Überblick über die Statistiken gibt Tab.09.

Vergleich der Toxizitätsausprägung	DS-ALL Dosissteigerung Block 1 → Block 2		DS-ALL Dosisreduktion Block 1 → Block 2	
	p= *	Ausprägung	p=*	Ausprägung
Leukozytopenie	<i>p</i> =.068	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.500	Block 1 = Block 2
Thrombopenie	<i>p</i> =.234	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.188	Block 1 = Block 2
Infektion	<i>p</i> =.748	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.031	Block 1 > Block 2
Stomatitis	<i>p</i> =.197	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.016	Block 1 > Block 2
Leberenzyme	<i>p</i> =.331	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.156	Block 1 = Block 2
Kreatinin	<i>p</i> =.655	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.500	Block 1 = Block 2
Bilirubin	<i>p</i> =.317	Block 1 = Block 2	<i>p</i> =.125	Block 1 = Block 2

Tab.09: Statistik zum Vergleich der Toxizitätsschweregrade bei DS-ALL-Patienten mit gesteigerter oder reduzierter MTX-Dosis im Verlauf von Block 1 zu Block 2. *Als signifikant gewertet wurden p-Werte $\leq .05$ nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Test.

Zusammenfassend konnte für Protokoll M gezeigt werden, dass DS-ALL-Patienten, die eine niedrige MTX-Dosis in Block 1 und eine ungefähr doppelt so hohe Dosis in Block 2 verabreicht bekamen, sich nicht signifikant in der Häufigkeit des Auftretens von höheren Toxizitätsausprägungen unterschieden. Patienten, die in Block 1 eine hohe Dosis erhielten und im zweiten Block reduziert wurden, litten nach Block 2 signifikant seltener an höhergradigen Stomatitiden und Infektionen. Auch die übrigen Nebenwirkungen schienen tendenziell weniger stark ausgeprägt zu sein.

5. Einfluss der MTX-Plasmaspiegel auf die Toxizitätsausprägung

Nun soll die Frage geklärt werden, ob die erhöhte Toxizität bei DS-ALL-Patienten auf höhere MTX-Plasmaspiegel zurückzuführen sein könnte. Untersucht wurden die MTX-Spiegel zu den Zeitpunkten 42 h und 48 h nach Start der MTX-Gabe des ersten Blocks, da zu diesen Zeitpunkten die Daten am vollständigsten vorlagen (DS-ALL im Schnitt 88,9%, NDS-ALL im Schnitt 83,7% Vollständigkeit). Die Verteilung der MTX-Plasmaspiegel war nicht normalverteilt (nicht gezeigt).

5.a) Unterschiede der medianen MTX-Spiegel bei 42 h bzw. 48 h nach Block 1

Zunächst wurden die medianen MTX-Plasmaspiegel nach 42 bzw. 48 h für unterschiedliche MTX-Dosierungen für DS-ALL und NDS-ALL berechnet und diese miteinander verglichen (Abb.14). Nach 42 h und 48 h maßen die medianen MTX-Spiegel bei allen Dosierungen bei DS-ALL 0,410 $\mu\text{mol/l}$ (Range jeweils in $\mu\text{mol/l}$: 0,05 – 4,60) bzw. 0,320 $\mu\text{mol/l}$ (0,01 – 3,60). Nach Subgruppierung anhand niedriger und hoher MTX-Dosis zeigten sich nach 42 bzw. 48 h für DS-ALL_{Dosis L} MTX-Spiegel mit 0,210 $\mu\text{mol/l}$ (0,05 – 3,40) bzw. 0,155 $\mu\text{mol/l}$ (0,01 – 1,80) und für DS-ALL_{Dosis H} 0,900 $\mu\text{mol/l}$ (0,17 – 4,60) bzw. 0,430 $\mu\text{mol/l}$ (0,22 – 3,60). Die medianen MTX-Plasmaspiegel für sämtliche NDS-ALL-Patienten gemeinsam und NDS-ALL, die Dosis H bekamen, waren gleich: Jeweils 0,500 $\mu\text{mol/l}$ (0,04 – 21,60) für 42 h und 0,310 $\mu\text{mol/l}$ (0,00 – 10,99) für 48 h.

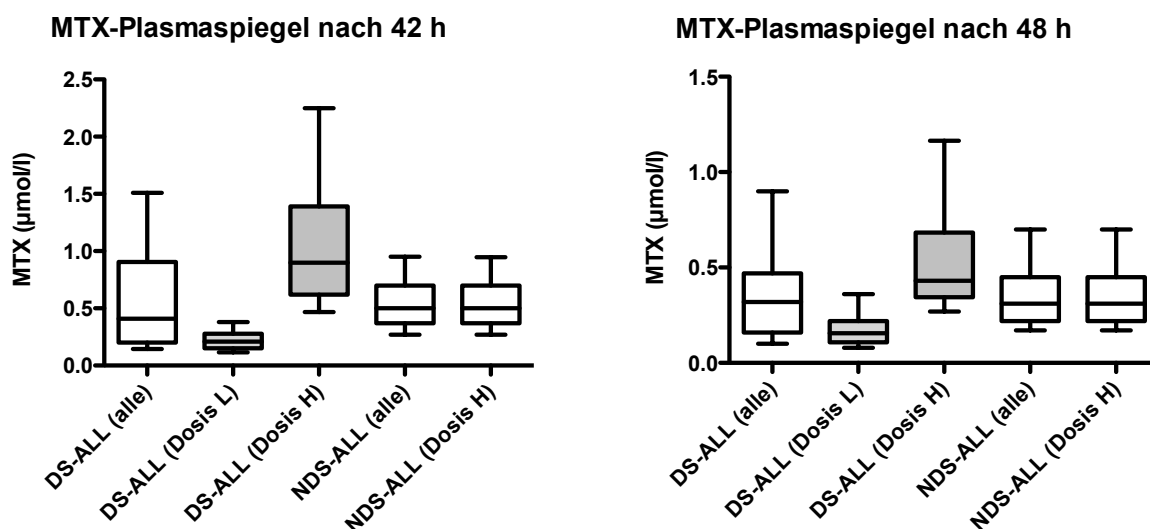


Abb.14. MTX-Plasmaspiegel 42 h (links) und 48 h (rechts) nach Gabe des ersten MTX-Blocks an DS-ALL- bzw. NDS-ALL-Patienten. Auch die Subgruppen mit niedriger Dosis L und hoher Dosis H sind dargestellt. Die Mediane werden durch horizontale Striche repräsentiert, die Whiskers stellen die 10. – 90- Perzentile dar. MTX-Dosierungen: Dosis H: 5000 mg/m^2 , Dosis M: 551 – 4499 mg/m^2 , Dosis L: 500 mg/m^2 .

Betrachtet man nun alle DS-ALL-Patienten gemeinsam – also unabhängig davon, ob sie in Block 1 eine hohe, mittlere oder niedrige MTX-Dosis erhalten haben – und vergleicht deren medianen MTX-Plasmaspiegel mit dem aller NDS-ALL-Patienten, so zeigen die NDS-ALL-Patienten einen signifikant höheren MTX-Spiegel zum Zeitpunkt 42 h nach Start von Block 1 (42 h: DS-ALL_{alle}: Median = 0,410 $\mu\text{mol/l}$, NDS-ALL_{alle}: Median 0,500 $\mu\text{mol/l}$, $p=.029$). Dieser Unterschied ist bei 48 h nicht mehr erkennbar

(48 h: DS-ALL_{alle}: Median = 0,320 µmol/l, NDS-ALL_{alle}: Median 0,310 µmol/l, n.s., p=.213). Vergleicht man hingegen nur DS-ALL- und NDS-ALL-Patienten, die eine hohe MTX-Dosis appliziert bekamen, so zeigten DS-ALL sowohl nach 42 h als auch nach 48 h einen signifikant höheren medianen MTX-Spiegel (42 h: DS-ALL_{Dosis H}: Median = 0,900 µmol/l, NDS-ALL_{Dosis H}: Median 0,500 µmol/l; 48 h: DS-ALL_{Dosis H}: Median = 0,430 µmol/l, NDS-ALL_{Dosis H}: Median 0,310 µmol/l, beide jeweils p<.001). Im Vergleich dazu, haben DS-ALL-Patienten mit niedriger Dosis zu beiden Zeitpunkten einen signifikant niedrigeren MTX-Spiegel als NDS-ALL-Patienten (42 h: DS-ALL_{Dosis L}: Median = 0,210 µmol/l, NDS-ALL_{alle}: Median 0,500 µmol/l; 48 h: DS-ALL_{Dosis L}: Median = 0,155 µmol/l, NDS-ALL_{alle}: Median 0,310 µmol/l, beide jeweils p<.001). Dies ist besonders interessant im Hinblick auf die oben gemachte Beobachtung, dass DS-ALL-Patienten trotz niedriger Dosis dennoch mehr MTX-assoziierte Toxizitäten als NDS-ALL-Patienten erleiden (siehe Abschnitt 3.a) und Abb.10C im gleichen Abschnitt). Innerhalb der Down Syndrom-Kohorte konnte ebenfalls zu beiden Zeitpunkten ein signifikant niedriger medianer MTX-Spiegel bei DS-ALL-Patienten mit niedriger MTX-Dosis im Vergleich zu Patienten mit hoher Dosis beobachtet werden (42 h und 48 h: beide jeweils p<.001).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DS-ALL-Patienten nach einer hohen Dosis MTX einen signifikant höheren medianen MTX-Plasmaspiegel aufweisen, als NDS-ALL-Patienten, die eine gleichhohe Dosis verabreicht bekamen. Deutlich niedrigere MTX-Spiegel hingegen fanden sich bei DS-ALL-Patienten, die eine niedrige MTX-Dosis erhielten.

5.b) MTX-Plasmaspiegel-Toxizitätsbeziehung innerhalb der DS-ALL-Kohorte

Um zu prüfen, ob es nach Block 1 innerhalb der DS-ALL-Kohorte eine MTX-Plasmaspiegel-Toxizitätsstärke-Beziehung gibt, wurde zunächst die Kohorte anhand ihrer MTX-Spiegel bei 42 h und 48 h in vier etwa gleich große Quartilen eingeteilt und dann jeweils die Toxizitäten aus der höchsten und niedrigsten MTX-Quartile verglichen. Die Quartilenbereiche waren für 42 h: 1.Q_{42h} (niedrigste, Perzentile 0 bis 25): 0,000 - ≤ 0,200 µmol/l (n= 24/103) bzw. 4.Q_{42h} (höchste, Perzentile 75 bis 100): ≥ 0,905 µmol/l (n= 23/103) und für 48 h: 1.Q_{48h}: 0,000 - ≤ 0,160 µmol/l (n= 25/103) bzw. 4.Q_{48h}: ≥ 0,470 µmol/l (n= 22/103). Einige Toxizitäten werden graphisch in Abb.15 gegenübergestellt und Tab.10 gibt einen Überblick über die Statistik.

Toxizitätsausprägung bei DS-ALL in unterschiedlichen MTX-Spiegelbereichen

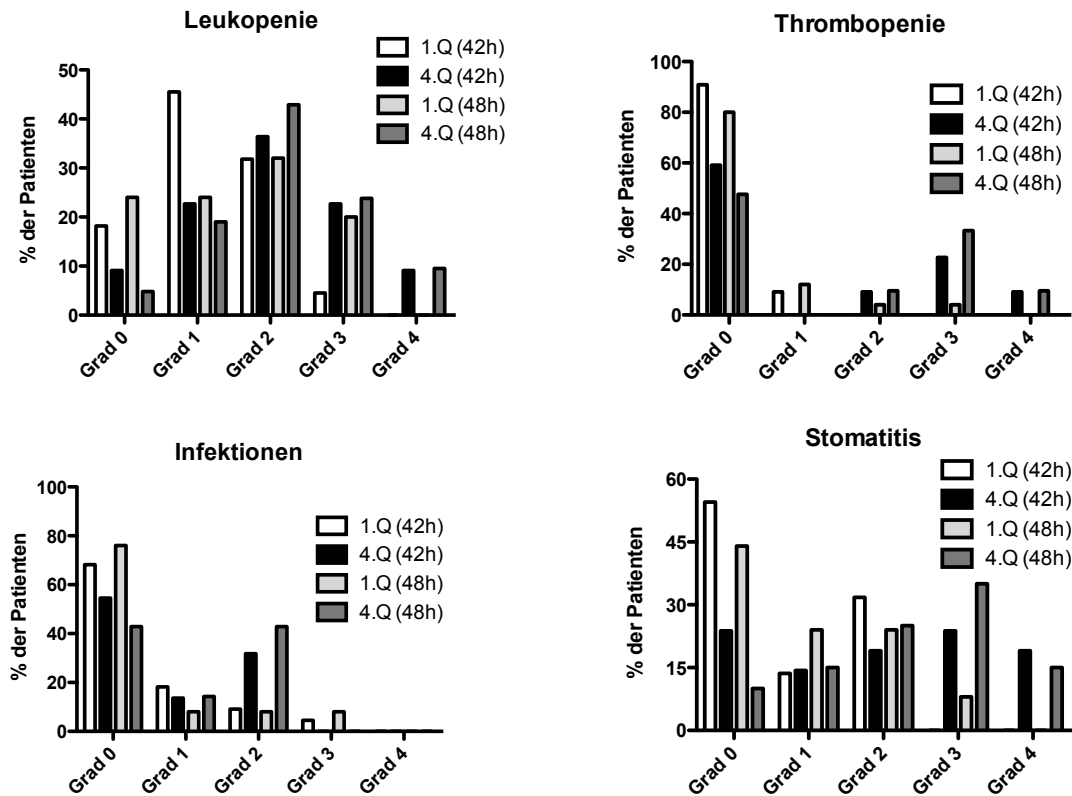


Abb.15. Vergleich der Häufigkeiten der Toxizitätsschweregrade bei DS-ALL-Patienten in unterschiedlichen MTX-Spiegelbereichen nach 42 h und 48 h nach dem ersten MTX-Block. Erste Quartile: 1.Q, vierte Quartile: 4.Q. Signifikante Unterschiede konnten bei 42 h bei Leukopenie, Thrombopenie und Stomatitiden festgestellt werden ($p=.016$, $p=.008$ und $p=.005$). Bei 48 h zeigte sich bei Thrombozytopenie, Infektionen, Stomatitiden und Bilirubinerhöhungen ein signifikanter Unterschied ($p=.006$, $p=.040$, $p=.001$ und $p=.009$). Nicht gezeigt werden Kreatinin-, Leber- und Bilirubinerhöhungen. Als signifikant gewertet wurden p -Werte $\leq .05$ nach dem Mann-Whitney-U-Test.

Vergleich der Toxizitätsausprägung	DS-ALL nach 42 h 1.Q _{42h} vs. 4.Q _{42h}		DS-ALL nach 48 h 1.Q _{48h} vs. 4.Q _{48h}	
	p=*	Ausprägung	p=*	Ausprägung
Leukozytopenie	p=.016	1.Q _{42h} < 4.Q _{42h}	p=.057	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Thrombozytopenie	p=.008	1.Q _{42h} < 4.Q _{42h}	p=.006	1.Q _{48h} < 4.Q _{48h}
Infektion	p=.293	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	p=.040	1.Q _{48h} < 4.Q _{48h}
Stomatitis	p=.005	1.Q _{42h} < 4.Q _{42h}	p=.001	1.Q _{48h} < 4.Q _{48h}
Leberenzyme	p=.601	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	p=.282	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Kreatinin	p=.197	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	p=.458	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Bilirubin	p=.086	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	p=.009	1.Q _{48h} < 4.Q _{48h}

Tab.10. Statistik zum Vergleich der Toxizitätsschweregrade bei DS-ALL-Patienten mit MTX-Plasmaspiegeln im ersten bzw. vierten Quartile 42 h und 48 h nach MTX-Block 1. *Als signifikant gewertet wurden p-Werte $\leq .05$ nach dem Mann-Whitney-U-Test.

DS-ALL-Patienten, deren MTX-Plasmalevel nach 42 h $\geq 0,905 \mu\text{mol/l}$ betrug, litten signifikant häufiger an höhergradigen Leukopenien, Thrombopenien und Stomatitiden ($p=.016$, $p=.008$ und $p=.005$) als Patienten mit einem MTX-Spiegel im untersten Quartil. Zum Zeitpunkt 48 h nach Block 1 konnten signifikante Unterschiede bei Thrombopenien, Infektionen, Stomatitiden sowie Bilirubinerhöhungen festgestellt werden ($p=.006$, $p=.040$, $p=.001$ und $p=.009$). Patienten mit einem MTX-Spiegel $\geq 0,470 \mu\text{mol/l}$ litten dann häufiger bzw. stärker an diesen Nebenwirkungen. Auch eine Tendenz hinsichtlich stärkerer Leukozytopenie bei MTX-Spiegeln im vierten Quartil war erkennbar (n.s., $p=.057$).

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass DS-ALL-Patienten mit MTX-Spiegeln im ersten Quartil deutlich häufiger die niedrige MTX-Dosis L erhielten (42 h: Dosis L 21/24; 48 h: Dosis L 25/25) und Patienten des vierten Quartils häufiger Dosis H (42 h: 21/23; 48 h: Dosis H 20/22).

Um zu prüfen, ob schwerer ausgeprägte Toxizitäten bei Patienten auftraten, die über einen längeren Zeitraum erhöhte MTX-Spiegel aufwiesen, wurde zudem der MTX-Plasmaspiegel zum Zeitpunkt 54 h nach Gabe von Block 1 untersucht. Bei 23 der 103 DS-ALL-Patienten (22,3%, 22-mal Dosis H, einmal Dosis L) wurde ein MTX-Spiegel nach 54 h bestimmt (Median_{54h} $0,320 \mu\text{mol/l}$ (Range $0,020 - 1,570$)). Diese Patienten zeigten auch höhere MTX-Spiegel bei 42 h und 48 h im Vergleich zu Patienten, bei denen kein 54 h-Spiegel gemessen wurde/werden musste (Mit 54 h-

Spiegel: Median_{42h} 0,920 µmol/l (0,410 – 4,060), Median_{48h} 0,500 µmol/l (0,290 – 1,910); ohne 54 h-Spiegel: Median_{42h} 0,260 µmol/l (0,050 – 4,600), Median_{48h} 0,220 µmol/l (0,010 – 3,600)). Jedoch unterschieden sich die Toxizitätsausprägungen der Patientengruppen mit bzw. ohne 54 h-Plasmaspiegel – mit Ausnahme eines erhöhten Bilirubinwertes bei Patienten mit 54 h-Spiegeln ($p < .001$) – nicht signifikant voneinander (nicht gezeigt). Außer einem einzelnen Messwert für 72 h nach Block 1, standen Daten für spätere Zeitpunkte nicht zur Verfügung.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass DS-ALL-Patienten mit hohen/höheren MTX-Plasmaspiegeln nach MTX-Block 1 signifikant mehr Toxizität erleiden, als DS-ALL-Patienten mit niedrigerem Spiegel. Dies betraf v.a. die Häufigkeit bzw. Schwere an Leukopenien, Thrombopenien, Infektionen, Stomatitiden, sowie Bilirubinerhöhungen und war zum Zeitpunkt 48 h nach Gabe des ersten MTX-Blocks von Protokoll M etwas ausgeprägter.

5.c) Könnten neue Cut-offs für forcierte Diurese und Leucovorin-Rescue helfen?

Da, wie oben in Abschnitt 3.a) gezeigt, DS-ALL-Patienten trotz niedriger MTX-Dosis immer noch mehr Toxizität als NDS-Patienten erleiden und es, wie in Abschnitt 5.b) gezeigt, innerhalb der DS-Kohorte eine gewisse MTX-Spiegel-Toxizitätsbeziehung gibt, soll nun geprüft werden, ob neue MTX-Plasmaspiegelgrenzwerte für forcierte Diurese bzw. LCV-Rescue für DS-ALL-Patienten eine Möglichkeit darstellen könnten, die MTX-assoziierten Toxizitäten bei DS-ALL abzumildern.

Die Cut-offs der MTX-Plasmaspiegel der ALL-BFM-Studien 95, 2000 und 2009 lagen bei $\geq 1,000$ µmol/l für 42 h und $\geq 0,400$ µmol/l für 48 h. Diese Grenzwerte werden von DS-ALL-Patienten nach Gabe einer niedrigen MTX-Dosis nur in einem Fall bei 42 h und zwei Fällen bei 48 h überschritten. Da Dosis L-Patienten dennoch hohe Toxizitätsausprägungen erfahren, wäre eine Absenkung der Grenzwerte für forcierte Diurese und LCV-Rescue ein möglicher Ansatz den Schweregrad der Nebenwirkungen zu mildern.

Zunächst werden die MTX-Plasmaspiegel aller Niedrigdosis-DS-ALL-Patienten zusammengefasst und deren Quartilengrenzen bestimmt. Die Quartilenbereiche sind für 42 h: 1.Q_{42h}: 0,000 - $\leq 0,150$ µmol/l ($n = 13/24$) bzw. 4.Q_{42h}: $\geq 0,278$ µmol/l ($n = 11/24$) und für 48 h: 1.Q_{48h}: 0,000 - $\leq 0,108$ µmol/l ($n = 10/20$) bzw. 4.Q_{48h}: $\geq 0,220$

$\mu\text{mol/l}$ ($n= 10/20$). Danach wurden – analog zu Abschnitt 5.b) – die Toxizitätsausprägungen der Patienten der ersten mit denen der vierten MTX-Quartile verglichen und die Ergebnisse in Tab.11 dargestellt.

Vergleich der Toxizitätsausprägung	DS-ALL nach 42 h 1.Q _{42h} vs. 4.Q _{42h}		DS-ALL nach 48 h 1.Q _{48h} vs. 4.Q _{48h}	
	p=*	Ausprägung	p=*	Ausprägung
Leukozytopenie	$p=.044$	1.Q _{42h} < 4.Q _{42h}	$p=.089$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Thrombozytopenie	$p=.347$	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	$p=.165$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Infektion	$p=.923$	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	$p=.968$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Stomatitis	$p=.037$	1.Q _{42h} < 4.Q _{42h}	$p=.123$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Leberenzyme	$p=.487$	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	$p=.481$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Kreatinin	$p=.695$	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	$p=.739$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}
Bilirubin	$p=1.000$	1.Q _{42h} = 4.Q _{42h}	$p=1.000$	1.Q _{48h} = 4.Q _{48h}

Tab.11. Statistik zum Vergleich der Toxizitätsschweregrade bei DS-ALL-Patienten mit MTX-Plasmaspiegeln der ersten bzw. vierten Quartile 42 h und 48 h nach Gabe einer niedrigen MTX-Dosis in Block 1. *Als signifikant gewertet wurden p-Werte $\leq .05$ nach dem Mann-Whitney-U-Test. MTX-Dosierung Dosis L: 500 mg/m^2 .

Patienten, deren MTX-Spiegel bei 42 h im unteren Quartil lag, zeigten signifikant weniger schwere Leukopenien und Stomatitiden ($p=0.44$ bzw. $p=.037$). Für 48 h konnte kein Unterschied festgestellt werden. Somit könnte ein neuer, möglicher Grenzwert für forcierte Diurese bzw. LCV-Rescue bei DS-ALL für den 42 h-MTX-Spiegel im Bereich zwischen $0,250 - 0,300 \mu\text{mol/l}$ liegen. Für 48 h müsste ein Grenzwert bei ca. $0,150 \mu\text{mol/l}$ liegen; erst hierbei lassen sich signifikant höhere Schweregrade an Leukopenie, Thrombopenie und Stomatitis ($p=.016$, $p=.020$ und $p=.013$) in der $> 0,150 \mu\text{mol/l}$ -Gruppe beobachten (nicht gezeigt). Zu beachten gilt auch hier die recht kleinen Fallzahlen, die für diese Untersuchung zur Verfügung standen.

6. Einfluss des Single-nucleotide-Polymorphismus rs1051266 auf die Toxizitätsausprägung und MTX-Plasmaspiegel bei DS-ALL

6.a) Häufigkeiten der Allelkombinationen

Der auf Chromosom 21 kodierte Folat-Carrier SLC19A1 stellt den Hauptaufnahmetransporter von MTX in Zellen dar. Der G80A-SNP rs1051266 führt zu einem Aminosäureaustausch in der ersten Transmembrandomäne und könnte möglicherweise die Transportrate von MTX in die Zellen hinein beeinflussen. Da Kinder mit Down Syndrom in jeder Körperzelle das Chromosom 21 in dreifacher Ausführung vorliegen haben, könnte das dreimalige Vorhandensein (d.h. homozygoter Status) des als aktivere Form beschriebenen A-Allels, zu einer erhöhten MTX-Aufnahme und somit zu höheren Toxizitätsausprägungen führen. Um dies zu untersuchen wurden die Allelhäufigkeiten bei DS-ALL-Patienten mittels eines TaqMan-basierten Allelic Discrimination Assays bestimmt. Allel-Informationen standen für die DS-ALL-Kohorte bei 95 der 103 DS-ALL-Patienten zur Verfügung (für 7 Patienten war kein Material verfügbar, bei einem schlug die Genotypisierung fehl), für die NDS-ALL-Vergleichskohorte bei 107 von 1109 Patienten (Daten wurden freundlicherweise von S. Radtke zur Verfügung gestellt, Ref. 67). Ein Überblick über die Allelkombinationshäufigkeit samt Literaturwerte gibt Tab.12.

DS Allele	n=	%	Literatur*
GGG	21	22,1%	24%
GGA	36	37,9%	33%
GAA	27	28,4%	28%
AAA	11	11,6%	15%

NDS Allele	n=	%	Literatur*
GG	35	32,7%	30%
GA	53	49,5%	50%
AA	19	17,8%	20%

Tab.12. Häufigkeiten der Allelkombinationen des SNP G80A bei DS und NDS.

*Literaturangaben nach Ref. 57 und 79.

6.b) Allelkombinationen und Toxizität

Wie in den vorherigen Untersuchungen wurde die Toxizität nach MTX-Block 1 ausgewertet. Da – wie oben in Abschnitt 3.b) gezeigt – DS-ALL-Patienten mit niedriger MTX-Dosis signifikant weniger Toxizität zeigen als Patienten mit hoher Dosis, wurde zuerst geprüft, ob sich die MTX-Dosierungen in Block 1 zwischen den Allelgruppen unterschieden. Patienten mit der Allelkombination AAA bekamen etwas

häufiger Dosis H verabreicht als Dosis L (Dosis H: n= 6/11, 54,5%; Dosis L: n= 5/11, 45,5%). Patienten der Allelgruppe GGG bekamen etwas häufiger niedrigere MTX-Dosen (Dosis H: n= 9/21, 42,9%; Dosis M: n= 2/21, 9,5%, Dosis L: n= 10/21, 47,6%). Tab.13 und Abb.16 geben einen Überblick über die Verteilung der Toxizitätsschweregrade nach Block 1 bei den Allelkombinationen GGG und AAA bei DS-ALL-Patienten.

Toxizitätsausprägungen bei DS-ALL mit unterschiedlichen *SLC19A1*-Allelkombinationen

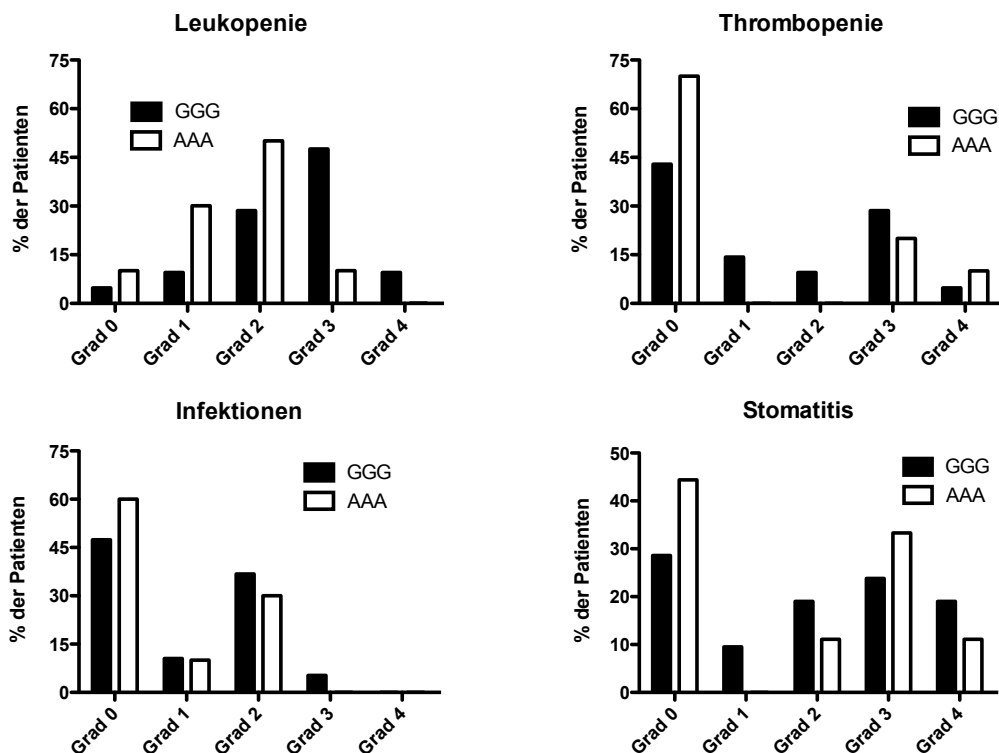


Abb.16. Häufigkeiten der Toxizitätsschweregrade nach MTX-Block 1 bei DS-ALL mit *SLC19A1* G80A-Allelkombination GGG im Vergleich zu Kombination AAA. Berücksichtigt wurden sämtliche MTX-Dosierungen in Block 1. Ein signifikanter Unterschied wurde nur bei Leukopenien festgestellt ($p=0.020$, Mann-Whitney-U-Test). Nicht gezeigt werden Kreatinin-, Leberenzym- und Bilirubinerhöhungen.

Die beiden Allelgruppen unterschieden sich, mit Ausnahme der Leukozytopenieausprägung, nicht signifikant voneinander. Die Allelkombination GGG zeigte häufiger Grad 3 und 4 Leukopenien im Vergleich zu AAA (Tab.13, $p=0.020$). Auch die Analyse der Toxizitäten nach Block 2 bis 4 zeigte keine Unterschiede (nicht gezeigt). Zudem konnten keine Unterschiede zwischen anderen Allelkombinationen (wie zum Beispiel GGA oder GAA) festgestellt werden (nicht gezeigt).

Block1 Toxizität	DS (GGG) Grad 3 und 4		DS (AAA) Grad 3 und 4		p=
	n=*	%	n=*	%	
Leukozytopenie	12/21	57,1%	1/10	10%	<i>p=.020</i>
Thrombozytopenie	7/21	33,3%	3/10	30%	<i>p=1.000</i>
Infektion	1/21	4,8%	0/10	0%	<i>p=1.000</i>
Stomatitis	9/21	42,9%	4/9	44,4%	<i>p=1.000</i>
Leberenzyme	6/21	28,6%	1/10	10%	<i>p=.379</i>
Kreatinin	0/21	0%	0/10	0%	<i>n.a.</i>
Bilirubin	0/21	0%	1/10	10%	<i>p=.323</i>

Tab.13. Grad 3 und 4 Toxizitäten nach Block 1 für die Allelkombinationen GGG und AAA bei DS-ALL. *Nicht bei allen Patienten standen die Toxizitätsinformationen für alle untersuchten Toxizitäten zur Verfügung, daher im Nenner Abweichungen zur Gesamtpatientenzahl der Kohorte. n.a., nicht anwendbar. p-Werte $\leq .05$ nach Fisher's exact-Test wurden als statistisch signifikant gewertet.

Zum Vergleich wurden zudem die Toxizitäten bei den Allelkombinationen GG und AA von NDS-ALL-Patienten untersucht. Von den 35 NDS-ALL mit GG erhielten im ersten MTX-Block 34 die Dosis H und ein Patient Dosis M. Bei der AA-Kombination erhielten von den insgesamt 19 Patienten 17 die Dosis H und 2 die Dosis M. NDS-Patienten, bei denen die Allelinformationen vorhanden waren, unterschieden sich bezüglich der MTX-assoziierten Toxizitäten nicht von den NDS-Patienten, für die keine Allelinformationen verfügbar waren (nicht gezeigt). Einen Überblick über die Häufigkeiten von hohen Toxizitätsschweregraden bei GG und AA gibt Tab.14.

Die Allelsubgruppen bei NDS-Patienten zeigten keine Unterschiede in der Häufigkeit von schweren Toxizitätsausprägungen. Zudem zeigten sich weder bei den Toxizitätsniveaus noch bei den Hoch- oder Niedrigtoxizitätsgruppen Unterschiede (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte lediglich eine etwas stärker ausgeprägte Leukopenie bei DS-ALL-Patienten mit SLC19A1 G80A-Allelkombination GGG im Vergleich zu AAA festgestellt werden. Ausprägungsgrade aller anderen MTX-assoziierten Toxizitäten, wie beispielsweise bei Stomatitiden, zeigten keine Assoziation zu der vorliegenden Allelkombination. Bei den NDS-ALL-Patienten konnten ebenfalls keine Unterschiede

der Toxizitäten für die beiden Allelkombinationen GG und AA festgestellt werden. Es sei jedoch erwähnt, dass die untersuchten Subgruppen, v.a. bei DS-ALL recht kleine Fallzahlen aufwiesen (z.B. AAA: n= 10/11, nur für 10 der 11 Patienten lagen Toxizitätsdaten vor) und dies die Aussagekraft der Statistiken einschränkt. Zudem waren die in Block 1 verabreichten MTX-Dosen zwischen den beiden DS-ALL-Gruppen unterschiedlich.

Block1 Toxizität	NDS (GG) Grad 3 und 4		NDS (AA) Grad 3 und 4		
	n=*	%	n=*	%	p=
Leukozytopenie	7/35	20,0%	6/19	31,6%	<i>p</i> =.506
Thrombozytopenie	1/35	2,9%	1/19	5,3%	<i>p</i> =1.000
Infektion	0/34	0%	0/19	0%	<i>n.a.</i>
Stomatitis	3/35	8,6%	2/19	10,5%	<i>p</i> =1.000
Leberenzyme	2/35	5,7%	2/19	10,5%	<i>p</i> =.607
Kreatinin	0/35	0%	0/19	0%	<i>n.a.</i>
Bilirubin	0/35	0%	0/18	0%	<i>n.a.</i>

Tab.14. Grad 3 und 4 Toxizitäten nach Block 1 für die Allelkombinationen GG und AA bei NDS-ALL. *Nicht bei allen Patienten standen die Toxizitätsinformationen für alle untersuchten Toxizitäten zur Verfügung, daher im Nenner Abweichungen zur Gesamtpatientenzahl der Kohorte. *n.a.*, nicht anwendbar. *p*-Werte $\leq .05$ nach Fisher's exact-Test wurden als statistisch signifikant gewertet.

6.c) Allelkombinationen und MTX-Plasmaspiegel

Da im Abschnitt 5.b) eine gewisse Dosis-(Neben)wirkungs-Beziehung zwischen MTX-Dosis und Toxizität festgestellt wurde, soll nun der Einfluss der Allelkombinationen GGG und AAA bzw. GG und AA auf den MTX-Plasmaspiegel zu den Zeitpunkten 42 h und 48 h nach Gabe des ersten MTX-Blocks untersucht werden (Abb.17). Die medianen MTX-Spiegel bei DS-ALL betrugen bei 42 h bzw. 48 h für DS-ALL_{GGG} (n= 18/21): 0,575 µmol/l (0,11 – 4,60) bzw. 0,355 µmol/l (0,07 – 3,60) und für DS-ALL_{AAA} (n= 9/11): 1,140 µmol/l (0,14 – 3,40) bzw. 0,640 µmol/l (0,01 – 1,80). Für NDS-ALL ergaben die medianen MTX-Spiegel bei 42 h bzw. 48 h folgende Werte: NDS-ALL_{GG} (n= 27/35): 0,580 µmol/l (0,24 – 1,70) bzw. 0,300 µmol/l (0,14 – 3,20) und für NDS-ALL_{AA} (n= 17/19): 0,420 µmol/l (0,15 – 3,60) bzw. 0,270 µmol/l (0,05 – 1,80).

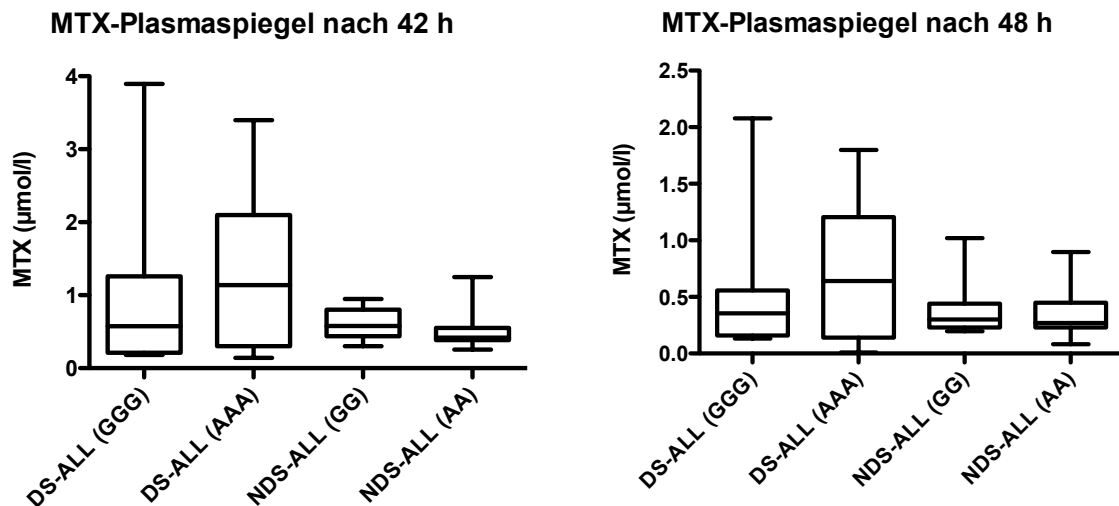


Abb.17. MTX-Plasmaspiegel 42 h (links) und 48 h (rechts) nach Gabe des ersten MTX-Blocks an DS-ALL- bzw. NDS-ALL-Patienten für die jeweiligen *SLC19A1* G80A-Allelkombinationen GGG und AAA bzw. GG und AA. Die Mediane werden durch horizontale Striche repräsentiert, die Whiskers stellen die 10. – 90. Perzentile dar.

NDS-ALL-Patienten beider rs1051266-Allelkombinationen hatten ungefähr vergleichbare MTX-Plasmaspiegel, sowohl 42 h als auch 48 h nach Gabe des ersten Therapieblocks von Protokoll M, wenn auch zur Stunde 42 ein leichter Trend zu höheren Spiegel bei Patienten mit der GG-Allelkombination zu erkennen war (42 h: $p=.063$, 48 h: $p=.587$).

Bei DS-ALL-Patienten war ebenfalls zu keinem der Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den MTX-Spiegeln der Allelkombinationen nachweisbar (42 h: $p=.274$, 48 h: $p=.433$), auch wenn das mediane MTX-Level bei AAA etwas höher liegt. Hier muss neben der geringen Fallzahl auch bedacht werden, dass DS-Patienten mit den AAA-Allelen häufiger höhere MTX-Dosen erhielten, als GGG-Patienten (s.o. unter Abschnitt 6.b)).

Zusammenfassend lässt sich kein statistisch aussagekräftiger Zusammenhang zwischen *SLC19A1* G80A-SNP Allelen und den gemessenen MTX-Plasmaspiegeln bei DS-ALL- und NDS-ALL-Patienten nachweisen.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde die MTX-assoziierte Toxizität bei pädiatrischen Leukämiepatienten mit Down Syndrom im HD-MTX-Therapieelement Protokoll M von drei aufeinander folgenden ALL-BFM-Studien näher untersucht. Ziel war es, die klinisch beobachteten starken MTX-abhängigen Nebenwirkungen genauer zu beschreiben, um diese besser verstehen zu können. Zudem wurde versucht, Faktoren zu identifizieren, die es bei DS-ALL ermöglichen, eine Vorhersage über die zu erwartende MTX-Verträglichkeit zu machen, da einige DS-ALL-Patienten die MTX-Therapie nebenwirkungsärmer überstehen als andere. Dazu wurden Daten zur Therapie, Toxizität und MTX-Plasmaspiegeln von 103 DS-ALL-Patienten aus drei ALL-BFM Studien (95/2000/2009) ausgewertet. Denen gegenübergestellt wurden 1109 NDS-ALL-Patienten als euploide Vergleichskohorte. Weiterhin wurden die Allelkombinationen des G80A SNP rs1051266 des MTX-Transporter-Gens *SLC19A1* bestimmt und mit den beobachteten Toxizitätsausprägungen und MTX-Spiegeln in Beziehung gesetzt.

1. Patientenkohorte

Diese Arbeit beschreibt die bisher größte DS-ALL-Patientenkohorte (n= 103) bezüglich ihrer MTX-assoziierten Toxizitäten. Neben dem Vorhandensein von ausführlichen Informationen bzgl. der Toxizitäten, zeichnet sich die hier beschriebene Patientenkohorte damit aus, dass sie zudem uniform nach ALL-BFM-Therapieprotokollen behandelt wurde.

Die hier untersuchten Charakteristika der DS-ALL- und NDS-ALL-Kohorte, wie beispielsweise die Immunphänotypen oder Zytogenetik, stimmten recht gut mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften überein^{1,17,19,21,22}. Somit konnte in dieser Studie eine repräsentative DS-Kohorte ausgewertet werden. Geringfügige Unterschiede zur Literatur z.B. bezüglich Erkrankungsalter, Geschlechterverteilung oder initialer Leukozytose lassen sich dadurch erklären, dass hier nur Patienten untersucht wurden, die das Therapieelement Protokoll M durchliefen; d.h. Patienten, die nach den ALL-BFM-Kriterien der jeweiligen Studie in die SR oder MR-Risikogruppe stratifiziert wurden. Die in der Literatur beschriebenen DS-ALL-Patienten umfassen meist auch Hochrisiko-Patienten, zudem sind die HR-Kriterien der verschiedenen Studien zwar ähnlich, aber nicht gleich¹⁷. Zudem muss bedacht

werden, dass hier nur Fälle ausgewertet werden konnten, bei denen die entsprechenden Therapie- und Toxizitätsdaten sowie die MTX-Plasmaspiegel zur Verfügung standen.

2. Verabreichte MTX-Dosis und Dosisveränderungen in Protokoll M

Bei der Betrachtung der in Protokoll M verabreichten MTX-Dosen der vier HD-MTX-Blöcke fiel auf, dass nahezu alle NDS-ALL-Patienten in allen Blöcken durchgehend eine MTX-Dosis von ungefähr 5000 mg/m^2 erhielten, wohingegen bei DS-ALL-Patienten vielerlei Dosisveränderungen/-anpassungen stattfanden. Neben Verläufen mit durchgehend hoher (5000 mg/m^2) oder niedriger (500 mg/m^2) MTX-Dosis, finden sich auch Patienten, deren Dosis im Verlauf von Protokoll M reduziert wurde, sowie solche, die mit einer niedrigen Dosis starteten und im Verlauf höherdosierte MTX-Gaben bekamen. Diese Heterogenität könnte zum einen als der erste Hinweis auf eine höhere Nebenwirkungsrate bei DS-ALL gedeutet werden. Sie könnte aber auch auf eine unterschiedlich große Suszeptibilität einzelner Patienten für MTX-assoziierte Toxizitäten innerhalb der DS-ALL-Kohorte hindeuten.

Hierbei sei erwähnt, dass die ALL-BFM-Studienkoordination im Jahre 2004 die Empfehlung gab, dass – aufgrund der erhöhten MTX-assoziierten Toxizität – DS-ALL-Patienten im ersten MTX-Block von Protokoll M zunächst eine niedrige MTX-Dosis von 500 mg/m^2 erhalten sollen. Wird diese gut vertragen, so kann die Dosis in den nächsten Blöcken – unter strenger Beobachtung der Toxizitäten – vorsichtig gesteigert werden. Auch andere ALL-Studiengruppen gaben ähnliche Empfehlungen für MTX-Gaben an DS-ALL-Patienten: entweder eine vorsichtige Dosisescalation nach initial niedriger Dosis (zwischen $500 - 2000 \text{ mg/m}^2$) oder eine Deckelung mit einer Maximaldosis von $500 - 1000 \text{ mg/m}^2$)⁶⁸.

Da hier in dieser Studie DS-ALL-Patienten aus den Jahren 1995 – 2016 untersucht wurden, führt die genannte Empfehlung der ALL-BFM-Studie zu einer höheren Heterogenität der Dosisverläufe, als wenn man nur die Zeiträume von 1995 – 2003 oder von 2004 – 2016 betrachtet hätte.

Dördelmann *et al.* konnten bereits für die ALL-BFM 81, 83, 86 und 90-Studien zeigen, dass bei über 40% DS-ALL-Patienten signifikante Therapiemodifikationen in Form von Dosisreduktion der Chemotherapeutika oder Therapieverzögerungen nötig

waren¹⁹. HD-MTX musste in knapp 15% der Fälle aufgrund von starker Mukositis oder ausgeprägter Knochenmarkssuppression reduziert werden. In der genannten Untersuchung wurde Dosisreduktion definiert als Reduktion der kumulativen Gesamtdosis des entsprechenden Therapieelements um > 20%¹⁹. Durch die im vorherigen Absatz beschriebene Empfehlung ist ein direkter Vergleich mit den Daten von Dördelmann *et al.* nur schwer möglich, da nach 2004 fast 3/4 der DS-ALL-Patienten zunächst mit einer niedrigen MTX-Dosis in Protokoll M starteten und davon ca. 2/3 im weiteren Verlauf sogar gesteigert werden konnten. Betrachtet man nur den Zeitraum 1995 – 2003 erhielten 52% der DS-ALL-Patienten durchgehend die volle Dosis und 48% wären nach den Kriterien von Dördelmann *et al.* als MTX-dosisreduziert einzuordnen. Auch Shah *et al.* berichten von Dosisreduktionen in 47% (n= 14/30) bei DS-ALL-Patienten, die mit MTX behandelt wurden (Startdosen lagen zwischen 1000 – 8000 mg/m², reduziert wurde jeweils um 25-50% der Startdosis oder die Therapie wurde verkürzt bzw. MTX-Gaben ausgelassen)⁶⁹. Derouet *et al.* berichten über 42% (n= 37/88), Goto *et al.* über 31% (n= 4/13) der DS-ALL-Patienten, bei denen eine Dosisreduktion – teils bereits bei Therapiebeginn, teils erst im Verlauf und nicht immer nur auf MTX beschränkt – vorgenommen wurde^{35,70}. Die Niederländer Buitenkamp *et al.* können von knapp 21% (n= 9/44) DS-ALL-Patienten berichten, die in den dortigen BFM-basierten Behandlungsprotokollen (DCOG-ALL-8, -9 und -10) im entsprechenden HD-MTX-Therapieelement in ihrer MTX-Dosis reduziert wurden³⁷.

Diese Beobachtungen, die o.g. Empfehlung für die BFM-ALL-Studien sowie Therapieempfehlungen anderer Studiengruppen, weisen darauf hin, dass man sich in den letzten Jahren der Therapie-assoziierten Toxizitäten und den daraus entstehenden Problemen bei ALL-Patienten mit DS bewusst und – gerade im Hinblick auf hochdosierte MTX-Gaben an diese Patientengruppe – zurückhaltender geworden ist.

Ob sich diese MTX-Dosisreduktionen im HD-MTX-Element Protokoll M oder vergleichbaren Elementen in Therapieprotokollen anderer Studiengruppen negativ auf das Gesamtüberleben, sowie das Event-freie Überleben auswirken, muss in Zukunft noch näher untersucht werden. Eine ausführlichere Diskussion zum Einfluss

von Therapiemodifikationen auf OS, EFS und Toxizität findet sich am Ende dieses Kapitels.

3. Untersuchung der Toxizitätsausprägungen nach dem ersten HD-MTX Block

Diese Arbeit konnte zeigen, dass DS-ALL-Patienten – nach der ersten MTX-Gabe in Protokoll M und unabhängig von der verabreichten MTX-Dosis – signifikant häufiger Grad 3 und 4 Thrombopenien (25,3% der Fälle), Infektionen (7,2%), Stomatitiden (30,6%), sowie Lebertransaminasenerhöhungen (16,5%) erlitten, als ihre NDS-ALL-Vergleichskohorte. Bezüglich Stomatitis als Marker für Mukositis stimmt diese Beobachtung gut mit den von Derouet *et al.* beschriebenen 30,9% Grad 3 und 4 Mukositiden nach MTX-Gabe überein. Dort wurden ebenfalls verschiedene MTX-Dosierungen für DS-ALL-Patienten gemeinsam betrachtet (1500 – 8000 mg/m²)⁷⁰. Dahingegen beobachteten Shah *et al.* nur bei 6 – 11% ihrer DS-ALL-Patienten eine schwere Mukositis nachdem MTX-Dosen von entweder 1000 – 2000 mg/m² oder 8000 mg/m² verabreicht wurden. Eine genaue Definition von „schwer“ im Sinne von CTCAE-Graden wurde dort jedoch nicht angegeben. Bezogen auf die gesamte Dauer der ALL-Therapie erlitten DS-Patienten insgesamt signifikant häufiger gastrointestinale Grad 3 und 4 Toxizitäten im Vergleich zu NDS-Patienten (53,3% vs. 18,3%). Zudem litten alle DS-Patienten im Verlauf ihrer Therapie mindestens einmal an einer Grad 3 oder 4 Infektion⁶⁹. Goto *et al.* beschrieben für 31% ihrer DS-ALL-Patienten eine Grad 3 Leberenzymerrhöhung und für 15% eine Grad 3 Knochenmarkstoxizität. Mukositiden wurden keine beobachtet (oder erwähnt). Die DS-Patienten erhielten 2 bis 4 Blöcke mit je 1000 – 3000 mg/m² MTX³⁵.

Die im vorherigen Absatz genannten Referenzen beschreiben meist relativ kleine Fallzahlen (13 – 88 DS-ALL-Patienten). Es wurden verschiedene MTX-Dosen und unterschiedliche Anzahlen an MTX-Blöcken verabreicht und HR und SR/MR-Patienten, trotz unterschiedlicher Therapieschemata, gemeinsam betrachtet. Zudem wurde oft die maximale Toxizitätsausprägung über alle Blöcke hinweg beschrieben. Diese Art der Darstellung berücksichtigt nicht eine mögliche Beeinflussung der Therapie (also die verabreichte MTX-Dosis und die daraus resultierende Toxizität) durch die Toxizitätsausprägungen in vorherigen Blöcken und die bereits vollzogenen Dosisreduktionen, die bei 31 – 63% der dort beschriebenen DS-ALL-Patienten stattfand^{35,69,70}.

Um dieses Problem zu umgehen und um eine möglichst wenig durch „Vorerfahrungen“ beeinflusste Beschreibung der MTX-assoziierten Toxizitäten zu ermöglichen, wurde sich in dieser Arbeit zunächst nur auf die Nebenwirkungen nach dem ersten MTX-Block in Protokoll M beschränkt. Hier wurde ein geringer Bias erwartet. Mögliche Einflussfaktoren, die die Dosierung in Block 1 beeinflussen könnten, wären beispielsweise die Verträglichkeit vorangegangener Therapieelemente und der Allgemeinzustand des Patienten zu Beginn von Protokoll M. Bei späteren HD-MTX-Blöcken könnten die Verträglichkeit der vorherigen HD-MTX-Blöcke und die bereits vollzogen Dosisanpassungen die Toxizitätsausprägungen zusätzlich beeinflussen und die Auswertung der Toxizitäten verzerren.

Buitenkamp *et al.* betrachteten ebenfalls den ersten HD-MTX-Block isoliert und konnten bei DS-ALL nach einer MTX-Dosis von 5000 mg/m^2 bei 34,2% der Patienten eine Grad 3 und 4 Mukositis feststellen, jedoch keine Grad 3 und 4 Leukopenie oder Thrombopenie. Für die letzteren beiden Toxizitäten lagen jedoch nur bei 5 bzw. 4 der 39 untersuchten Patienten mit hoher MTX-Dosis die entsprechenden Toxizitätsinformationen vor³⁷. Im Vergleich dazu zeigten sich bei der in unserer Arbeit untersuchten DS-ALL-Kohorte bei Patienten nach Gabe einer hohen MTX-Dosis im ersten Block ($n = 45/103$) bei 41,8% eine Grad 3 und 4 Stomatitis, sowie bei 43,2% und 32,6% eine Grad 3 und 4 Leukopenie bzw. Thrombopenie. Die Toxizitätsdokumentation dieser Subgruppe war in dieser Arbeit mit über 95% deutlich vollständiger.

Des weiteren konnten Buitenkamp *et al.* bei einem der 38 DS-ALL-Patienten nach HD-MTX-Gabe eine Grad 3 oder 4 Neurotoxizität feststellen³⁷. Neurotoxizitäten (Lethargie bis hin zu Koma oder Krämpfen) wurden in der hier vorliegenden Arbeit allerdings nicht betrachtet.

Nachdem DS-ALL-Patienten mit hoher MTX-Dosis in Block 1 betrachtet wurden, wurden nun die Toxizitätsausprägungen von DS-Patienten mit niedriger MTX-Dosis untersucht. Es konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch DS-ALL-Patienten, die eine MTX-Dosis von 500 mg/m^2 im ersten MTX-Block bekamen, signifikant häufiger an Grad 3 und 4 Infektionen, Stomatitiden sowie Leberenzym erhöhungen litten, als NDS-ALL-Patienten, die eine ca. 10-fach höhere

MTX-Dosis erhielten. DS-ALL-Patienten können also auch trotz deutlich reduzierter MTX-Dosis starke Nebenwirkungen erfahren; eine niedrige Dosierung schützt DS-Patienten nicht vor schweren MTX-assoziierten Toxizitäten.

Dieses Ergebnis veranschaulicht nicht nur die bereits beschriebene höhere Empfindlichkeit von DS-Patienten gegenüber MTX^{36,37,70}, sondern erweitert diese Beobachtung auch auf den Dosisbereich von 500 mg/m² ±10%. Bisherige Studien betrachteten MTX-Dosen bis minimal 1000 mg/m². Zudem waren die in der Literatur beschriebenen Unterschiede der Toxizitätsstärken zwischen DS- und NDS-Patienten nicht immer so deutlich wie in dieser Arbeit⁶⁹.

Dennoch kann bei DS-ALL-Patienten eine auf 500 mg/m² reduzierte MTX-Dosis die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Nebenwirkungen im Vergleich zu einer Dosis von 5000 mg/m² reduzieren. Im direkten Vergleich der Toxizitäten von DS-Patienten mit hoher und niedriger Dosis konnte hier gezeigt werden, dass Patienten nach niedriger MTX-Dosis signifikant weniger häufig an schweren Grad 3 und 4 Leukopenien, Thrombopenien, Infektionen und Stomatitiden litten als DS-ALL-Patienten, die eine hohe MTX-Dosis erhielten. Eine leichte Dosis-Nebenwirkungs-Beziehung konnte auch bei einer japanischen Publikation nachgewiesen werden, auch wenn die Fallzahlen recht gering waren (n= 13) und die verabreichten MTX-Dosen im Bereich von 1000 – 3000 mg/m² lagen. Dennoch ließ sich dort ein Trend zu stärkeren Nebenwirkungen bei höherer MTX-Dosis erkennen³⁵.

DS-ALL-Patienten, die eine niedrige MTX-Dosis erhielten, litten weniger häufig an Leukopenien < 2000/μl als NDS-ALL-Patienten. Dies könnte die Sorge aufkommen lassen, dass DS-ALL-Patienten durch die – zwar nebenwirkungsärmere – niedriger dosierte MTX-Gabe in HD-MTX-Therapieelementen langfristig ein verschlechtertes Outcome haben. Hoffnung geben jedoch zwei neuere Studien, die beispielsweise zeigen konnten, dass Dosisreduktionen bei DS-ALL nicht zu einem schlechteren Outcome führen^{69,70}. Ob dies auch für Kinder mit DS und ALL zutrifft, die nach ALL-BFM-Protokollen behandelt wurden/werden, muss in Zukunft unbedingt untersucht werden.

Die signifikante Reduktion an Grad 3 und 4 Infektionen in der 500 mg/m²-Kohorte ist positiv zu bewerten, da Infektionen die häufigste Todesursache für DS-Patienten während einer ALL-Therapie sind – ca. 76% aller Todesfälle können auf tödlich verlaufende Infektionen zurückgeführt werden²¹. Menschen mit DS haben aufgrund ihres Immundefektes, den anatomischen Besonderheiten im oberen Respirationstrakt, sowie einer erhöhten Rate an gastro-ösophagealem Reflux eine höhere Anfälligkeit für Infektionen, die zudem häufig einen vergleichsweise schwereren Verlauf nehmen¹⁶. Erkrankten Kinder mit DS an einer Leukämie und erhalten eine immunsupprimierende Polychemotherapie, kann sich die Anfälligkeit für Infektionen und deren Schweregrad deutlich erhöhen. Dies könnte u.a. dazu führen, dass behandelnden Ärzte bei DS-ALL-Patienten früher, d.h. bereits beim geringsten Verdacht auf eine Infektion, antibiotisch behandeln und somit in der Toxizitätsdokumentation eine Verzerrung hin zu mehr höhergradigen Infektionen stattfindet. Andererseits werden prophylaktische Gaben von antibiotischen und antifungalen Medikamenten an (v.a. neutropene, aber asymptomatische) DS-ALL-Patienten immer wieder diskutiert. Deren prophylaktischer Nutzen ist aber noch unklar⁶⁸. Schutz vor schweren Infektionen könnte jedoch eine reduzierte Exposition zu potentiell infektiösen Personen, sowie Schutzimpfungen gegen beispielsweise Influenzaviren für Familienmitglieder bieten⁶⁸.

4. Veränderung der Toxizitätsausprägungen im Verlauf von Protokoll M

Das Protokoll M der ALL-BFM-Studien sieht insgesamt vier HD-MTX-Gaben im Abstand von jeweils zwei Wochen vor. Aufgrund der sorgfältigen Therapie- und Toxizitätsdokumentation war es in dieser Arbeit erstmals möglich, sowohl die MTX-Dosisanpassungen als auch die unterschiedlichen Toxizitätsausprägungen im Verlauf einer Therapiephase mit HD-MTX-Gaben für DS-ALL-Patienten zu beschreiben und zu vergleichen.

Bei guter Verträglichkeit von niedrigdosiertem MTX im ersten Block, ist es im darauffolgenden Block möglich, DS-Patienten im Sinne einer Therapieeskalation eine höhere MTX-Dosis zu verabreichen. Für die hier untersuchte DS-Kohorte konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine MTX-Dosis von 500 mg/m² im ersten Block gut vertrugen und im zweiten Block eine doppelt so hohe Dosis erhielten, keine

höhere MTX-assoziierte Toxizität nach Block 2 erfahren. Damit scheint die derzeit empfohlene (vorsichtige) Dosissteigerung sicher zu sein.

Einzig ein Trend zu höhergradiger Leukopenie nach Dosissteigerung war erkennbar. Jedoch könnte eine stärkere Wirkung auf die Lymphopoese bzw. auf Leukämieblasten im Knochenmark durch eine höhere MTX-Dosis durchaus wünschenswert sein und einen positiven Effekt auf das Outcome haben¹⁷.

Bei DS-ALL-Patienten, die im ersten Block eine hohe Dosis erhielten und aufgrund von starker Toxizität im zweiten Block reduziert wurden, konnten v.a. das Auftreten von Infektionen und die Schwere von Stomatitiden abgemildert werden. Auch Thrombopenien und Lebertransaminasenerhöhungen waren – wenn auch nicht signifikant – weniger stark ausgeprägt. Aufgrund der geringen Fallzahlen für Patienten mit Dosisreduktion (n= 10) ist die Aussagekraft der Beobachtung jedoch eingeschränkt.

Beim Vergleich der Toxizitätsausprägungen nach Block 1 und Block 4 lässt sich für DS-ALL-Patienten im Verlauf eine signifikante Abnahme der Infektionen und Stomatitiden feststellen, wohingegen die Leukopenien im vierten Block stärker ausgeprägt waren. Da bei dieser Untersuchung alle an DS-Patienten verabreichten MTX-Dosen berücksichtigt wurden, wurden sämtliche Dosisanpassungen – sowohl Steigerungen, als auch Reduktionen – miteingefasst.

Infektionsraten und Stomatitiden waren auch bei NDS-ALL-Patienten in Block 4 reduziert, die Leukopenie ebenfalls stärker ausgeprägt als in Block 1. Auch die Hepatotoxizität, gemessen durch einen Leberenzymanstieg, war im vierten HD-MTX-Block bei NDS-ALL-Patienten signifikant stärker ausgeprägt. Dies könnte darin begründet sein, dass es bei NDS-Patienten seltener zu Therapieverzögerungen kam und sich die durch MTX verursachte Leberschädigung im Verlauf von Protokoll M aufsummiert. Ob es bei den hier untersuchten DS-Patienten häufiger zu Therapieverzögerungen in Protokoll M aufgrund von ausgeprägten Toxizitäten kam, ist in dieser Arbeit leider nicht untersucht worden. Arico *et al.* konnten keine signifikanten Verzögerungen in HD-MTX-Elementen bei DS-ALL-Patienten feststellen³⁴.

Beim Vergleich der aufgetretenen Nebenwirkungen nach MTX-Block 4 bei DS-ALL und NDS-ALL, ließen sich – trotz aller Dosisanpassungen bei DS-Patienten – immer noch signifikant höhere Grad 3 und 4 Toxizitäten bei Thrombopenien, Stomatitiden

und Transaminasenerhöhungen bei DS-ALL-Patienten nachweisen. Jedoch gab es interessanterweise keine Unterschiede mehr zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich der Schwere der Leukopenien und Infektionen. Leukopenien sind bei beiden Kohorten im Verlauf von Protokoll M schwerwiegender geworden und nach Block 4 ungefähr gleich stark ausgeprägt. Die Grad 3 und 4 Infektionen sind sowohl bei DS- als auch bei NDS-Patienten stark zurückgegangen.

5. Einfluss der MTX-Plasmaspiegel auf die Toxizitätsausprägung

Um den Einfluss der Höhe des MTX-Plasmaspiegel auf die beobachtete Toxizität bei DS-ALL-Patienten zu untersuchen, wurden die medianen MTX-Spiegel bei DS- und NDS-ALL-Patienten 42 und 48 Stunden nach Start des ersten MTX-Blocks verglichen. Nach Gabe einer hohen MTX-Dosis zeigten DS-ALL-Patienten nach 42 h einen signifikant höheren medianen MTX-Plasmaspiegel als NDS-Patienten mit gleicher Dosierung. Signifikant niedrigere MTX-Spiegel hingegen zeigten DS-ALL-Patienten, die eine niedrige MTX-Dosis erhielten.

Einen erhöhten 42 h-Spiegel bei DS-ALL-Patienten konnten auch Garré *et al.* feststellen: Nach MTX-Gaben von 1000 mg/m^2 war der mediane MTX-Spiegel bei DS-ALL-Patienten mit $0,470 \text{ } \mu\text{mol/l}$ höher als bei NDS mit $0,240 \text{ } \mu\text{mol/l}$. Die MTX-Clearance war bei DS tendenziell, aber nicht signifikant, niedriger. Zudem zeigten DS-Patienten im Vergleich zu NDS-Patienten häufiger Grad 2 bis 4 gastrointestinale Nebenwirkungen (36,0% vs. 3,6%) und häufiger Grad 3 und 4 Knochenmarks-Toxizitäten (13,4% vs. 0,9%)⁷¹. Die Autoren versuchen die erhöhte MTX-assoziierte Toxizität bei DS-ALL-Patienten durch eine bei DS möglicherweise veränderte MTX-Pharmakokinetik (wie z.B. einer langsameren, verzögerten Abgabe vom MTX aus peripheren Geweben) zu erklären. Auch eine Folat-Defizienz könnte Kinder mit DS empfänglicher für MTX-assoziierte Nebenwirkungen machen⁷¹. Da im Normalfall in den ALL-BFM-Studien keine HD-MTX-Gabe mit 1000 mg/m^2 verabreicht werden, ist ein direkter Vergleich nur bedingt möglich. Nur fünf Patienten der gesamten Studienpopulation erhielten eine solche Dosis. Die verfügbaren 42 h-MTX-Plasmaspiegel stimmten jedoch recht gut mit den von Garré *et al.* gemessenen Spiegel überein: DS-ALL mit 1000 mg/m^2 (n= 3) 42h: $0,410 \text{ } \mu\text{mol/l}$; NDS-ALL (n= 2) 42h: $0,230 \text{ } \mu\text{mol/l}$; angegeben ist jeweils der mediane MTX-Spiegel.

Andere Studien konnten keine Unterschiede zwischen DS und NDS bei MTX-Plasmaspiegeln oder der MTX-Eliminationszeit nach HD-MTX feststellen^{37,69}. Buitenkamp *et al.* fanden zwar eine um 5% geringere MTX-Clearance bei DS-ALL-Patienten, dennoch hielten die Autoren diesen pharmakokinetischen Unterschied für zu gering, als dass er (alleine) die massiv erhöhte MTX-assoziierte Toxizität bei DS erklären könnte. Vermutlich sind es eher pharmakodynamische Unterschiede, die für die Schwere der Toxizitäten bei DS-Patienten verantwortlich sind^{37,72}.

In dieser Arbeit konnte für DS-ALL-Patienten ein gewisser Zusammenhang zwischen der Höhe des MTX-Plasmaspiegels und der Toxizitäten v.a. für Thrombopenien und Stomatitiden, aber auch für Leukopenien, Infektionen und Bilirubinerhöhungen festgestellt werden, wobei höhere Spiegel mit stärkeren Toxizitäten assoziiert waren. Während eine andere Leukämiestudie zumindest einen tendenziellen Zusammenhang von verabreichter MTX-Dosis mit Toxizitätsstärke bei DS-ALL-Patienten beschreiben konnte³⁵, konnten Park *et al.* bei der Behandlung von pädiatrischen NDS-Patienten mit Osteosarkomen, die erhöhte 48 h-MTX-Spiegel aufwiesen, gleichzeitig auch höhergradige Mukositiden nachweisen⁶³. Demgegenüber konnten den Hoed *et al.* keine Korrelation zwischen MTX-Plasmaspiegel und dem Schweregrad von Mukositiden bei NDS-ALL-Patienten feststellen⁷³. Dort untersuchte man 134 pädiatrische NDS-ALL-Patienten, die nach dem ALL-BFM-basierten niederländischen DCOG-ALL-10-Protokoll mit je 5000 mg/m² MTX pro Block behandelt wurden. Nach dem ersten Block konnte bei 20% der Patienten eine Grad 3 oder 4 Mukositis festgestellt werden; dies ist knapp 4-mal so häufig wie die in dieser Studie dokumentierten Stomatitiden (hier: 5,8% der NDS-ALL-Patienten mit Grad 3 und 4 Stomatitis nach Block 1). Die Autoren fanden erhöhte Folat-Level in den Erythrozyten der Mukositis-Patienten. Sie spekulierten, dass dadurch weniger MTX in Erythrozyten aufgenommen werden könne und somit mehr MTX für den Uptake in Schleimhautzellen zur Verfügung stünde. Dies wiederum könnte dann zu einem erhöhten Schweregrad an Mukositis führen⁷³.

Eine weitere Studie untersuchte retrospektiv den Zusammenhang zwischen MTX-Plasmaspiegeln nach HD-MTX und Outcome bei NDS-ALL mit bzw. ohne Rezidiv⁷⁴. Die Autoren konnten keinen Unterschied bezüglich MTX-Spiegeln oder anderen pharmakokinetischen Parametern zwischen der Remissions- und der Rezidiv-

Kohorte feststellen. Sie merken – zu Recht – an, dass Betrachtungen der Pharmakokinetik eines einzelnen Medikamentes in einem komplexen Polychemotherapie-Protokoll wenig Aussagekraft hat⁷⁴. Auch in dieser Studie wurde die Gabe bzw. der Einfluss der Komedikation mit 6-MP in Protokoll M nicht näher untersucht. 6-MP ist ein Prodrug, dass im Körper zur aktiven Form 6-Thioguanin-Nukleotid (6-TGN) umgewandelt wird, das wiederum mit der zellulären Purin-Biosynthese interferiert³⁹. Palle *et al.* konnten zeigen, dass Kinder mit DS und einer AML signifikant höhere 6-TGN-Spiegel aufwiesen als ihre euploide Vergleichsgruppe⁷⁵. Für viele andere antileukämische Medikamente gibt es zur Zeit noch gar keine Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bei Kindern mit DS-ALL. Dort besteht ein dringender Forschungsbedarf. Denn um eine gute Balance zwischen optimalem Outcome und niedriger Toxizität bei der Behandlung von DS-ALL zu finden, müssen andere Medikamente in komplexen Behandlungsprotokollen berücksichtigt werden⁷². Dies gilt nicht nur in HD-MTX-Therapieelementen, sondern auch in anderen Therapiephasen, wie beispielsweise in der Erhaltungstherapie. Dort treten bei DS-ALL über 40% der Therapie-assoziierten Todesfälle auf²¹, daher könnte es gerade für DS-ALL-Patienten von Nutzen sein, dort die pharmakologischen Eigenschaften der verwendeten Medikamente – auch bezüglich der in der Erhaltungstherapie verwendeten Dosierungen – genauer zu untersuchen. Zudem sollten DS-ALL-Patienten in dieser Therapiephase engmaschiger ärztlich kontrolliert und möglichst Protokoll-adhärent behandelt werden, um einen optimalen Therapieerfolg zu gewährleisten^{68,76}.

Um übermäßige MTX-Toxizität zu verhindern, wird in den ALL-BFM-Studien nach HD-MTX-Gaben ein LCV-Rescue nach 42 h, 48 h und 54 h nach Start der MTX-Infusion mit je 15 mg/m² durchgeführt. Bei erhöhten MTX-Plasmaspiegeln zu diesen Zeitpunkten muss ein höher dosierter Rescue sowie eine verstärkte forcierte alkalische Diurese, durchgeführt werden. Die Cut-offs dafür lagen bei den ALL-BFM-Studien 95, 2000 und 2009 jeweils bei $\geq 1.000 \mu\text{mol/l}$ MTX für 42 h und $\geq 0.400 \mu\text{mol/l}$ für 48 h. Mittlerweile erhalten DS-ALL-Patienten im ersten MTX-Block zunächst eine niedrige Dosis, daher haben sie nur noch in sehr wenigen Fällen MTX-Spiegel, die über den o.g. Grenzwerten lagen. Da die Niedrigdosis-Patienten dennoch hohe Toxizitäten erleiden, wurde hier geprüft, ob eine Absenkung der Cut-offs für forcierte Diurese und LCV-Rescue einen möglichen Ansatz darstellen könnte,

den Schweregrad der Nebenwirkungen abzumildern. Um schwere Toxizitäten seltener auftreten zu lassen, müsste ein neuer Grenzwert für forcierte Diurese bzw. LCV-Rescue bei DS-ALL für den 42 h-MTX-Spiegel ungefähr im Bereich zwischen 0,250 – 0,300 µmol/l liegen, für 48 h bei ungefähr 0,150 µmol/l. Erst wenn DS-Patienten MTX-Spiegel unterhalb dieser Schwellenwerte hatten, zeigten sie signifikant niedrigere Toxizitätsausprägungen als Patienten, deren MTX-Spiegel oberhalb dieser Cut-offs lag. Ob ein nach den neuen (recht niedrigen) Grenzwerten durchgeführter LCV-Rescue und forcierte Diurese zu einer schnellen MTX-Spiegelsenkung und evtl. auch zu einer verminderter Toxizitätsausprägung führt, muss aber erst noch gezeigt werden. Den Hoed *et al.* konnten beispielsweise keine Assoziation zwischen MTX-Spiegel und Toxizität feststellen⁷³. Zudem könnte der antileukämische Effekt von MTX durch zu niedrige und zu kurzzeitige Spiegel beeinträchtigt sein und sich möglicherweise negativ auf den Therapieerfolg auswirken.

6. Einfluss des SLC19A1 G80A SNP rs1051266 auf die Toxizitätsausprägung und MTX-Plasmaspiegel bei DS-ALL

Der auf Chromosom 21 kodierte Folat-Carrier SLC19A1 ist hauptverantwortlich für den Transport von MTX in Körperzellen. Variationen im *SLC19A1*-Gen, wie beispielsweise SNPs, könnten durch eine geänderte Substrataffinität oder ein verändertes Expressionslevel zu einer Veränderung in der MTX-Transportrate führen^{58,77,78}. Der SNP rs1051266 an Position 80 (G80A) führt im translatierten Protein zu einem Aminosäureaustausch in der ersten Transmembrandomäne und könnte durch eine veränderte Konformation die Aufnahmerate von MTX in die Zellen beeinflussen^{58,59}.

Um den Einfluss des G80A SNP rs1051266 Polymorphismus des SLC19A1-Carriers auf die Toxizitätsausprägungen bei DS-ALL-Patienten nach HD-MTX zu untersuchen, wurden zunächst die Häufigkeiten der Allelkombinationen bestimmt. Die in dieser Arbeit gefundenen Häufigkeiten stimmten sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten überein – sowohl für DS- als auch für NDS-Patienten^{55-57,79}.

Baslund *et al.* konnten *in vitro* mit Zellen von euploiden Probanden zeigen, dass ein homozygoter Trägerstatus für das A-Allel (AA) zu einer höheren MTX-Aufnahme

führte⁵⁸. Kinder mit Down Syndrom haben in jeder Körperzelle das Chromosom 21 in dreifacher Ausführung vorliegen. Da der SLC19A1-Transporter auf diesem Chromosom kodiert ist, könnte das dreimalige Vorhandensein (d.h. homozygoter Status) der aktiveren Form zu einer vermehrten MTX-Aufnahme und zu stärker ausgeprägten Toxizitäten führen. Das Wissen um den Allel-Status könnte dann möglicherweise klinisch genutzt werden, um die zu erwartenden MTX-assoziierten Toxizitäten eines DS-ALL-Patienten vorherzusagen und die Therapie entsprechend zu steuern.

Diese Hypothese ließ sich hier jedoch nicht bestätigen: Die Ausprägung der Toxizitäten beider Allelgruppen bei DS-Patienten (AAA und GGG) unterschieden sich nicht voneinander. Einzig bei Leukopenien zeigte die Allelkombination GGG etwas stärkere Nebenwirkungen. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die betrachteten Fallzahlen recht klein und die Verteilung der an die Subgruppen verabreichten MTX-Dosen nicht gleich waren. Patienten mit AAA erhielten etwas häufiger eine hohe MTX-Dosis als GGG-Patienten. Dies spiegelte sich auch in den MTX-Plasmalevels wider, die bei AAA etwas – aber nicht signifikant – höher waren als bei GGG. Somit wäre es möglich, dass der Effekt auf die Leukozyten bei GGG sogar noch unterschätzt wurde. Ob die – ausschließlich nach MTX-Block 1 beobachteten – höhergradigen Leukopenien bei DS-ALL mit GGG-Allelkombination einen Vorteil für EFS oder OS bieten oder eher vernachlässigbar sind, muss in Zukunft noch genauer untersucht werden.

Ferner konnten auch bei NDS-ALL-Patienten keine Unterschiede der Toxizitätsausprägungen beim Vergleich der beiden Allelkombinationen GG und AA festgestellt werden; weder nach Block 1, noch nach den restlichen Blöcken. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis der von He *et al.* durchgeführten Metaanalyse überein, die keinen Einfluss des G80A-Polymorphismus auf MTX-assoziierte Toxizität bei pädiatrischen ALL-Patienten feststellen konnte⁸⁰.

In der Literatur gibt es kein Einvernehmen darüber, ob der G80A-Polymorphismus das Auftreten von schweren Toxizitäten nach MTX-Gabe beeinflusst: Einige Publikationen können keinen Effekt des SNP auf Toxizitäten nachweisen^{61,81-84}, wohingegen andere Veröffentlichungen signifikante, wenn auch uneinheitliche Ergebnisse zeigen: Während Gregers *et al.* bei NDS-ALL-Patienten nach 5000

mg/m² MTX ausgeprägtere Knochenmarkssuppressionen bei AA feststellen konnten, zeigten GG-Patienten stärkere Lebertoxizitäten⁶⁰. Im Gegensatz dazu konnte bei Erwachsenen ALL-Patienten mit AA-Allel nach einer MTX-Dosis von ca. 1000 mg/m² eine höhere Hepatotoxizität beobachtet werden⁸⁵. Kishi *et al.* konnten zeigen, dass in der Konsolidierungsphase und auch in der Erhaltungstherapie das Vorhandensein der A-Variante (AA bzw. GA) zu deutlich stärkeren gastrointestinalen Nebenwirkungen führt als bei GG⁶⁴. Dagegen sahen Shimasaki *et al.* dies während der Erhaltungstherapie häufiger bei Allelkombinationen mit der G-Variante (GG bzw. GA)⁸⁶.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur könnten dadurch zustande kommen, dass oft nur geringe Patientenzahlen betrachtet werden und die Behandlungsprotokolle, die verabreichten MTX-Dosen und die Anzahl der HD-MTX-Blöcke verschieden sind. Des Weiteren werden in verschiedenen Studien unterschiedliche Toxizitäten betrachtet und jeweils andere Grenzwerte für die Definition von „schwerer“ Toxizität verwendet. Zudem werden andere Faktoren, wie zum Beispiel zeitgleich verabreichte Medikamente nicht berücksichtigt.

Vor ähnlichen Problemen stehen Forscher, die den Effekt und die auftretenden Nebenwirkungen bei Erkrankungen wie z.B. Osteosarkomen oder rheumatoide Arthritiden untersuchen, für deren Behandlung MTX ebenfalls ein wichtiges Therapeutikum darstellt. Eine koreanische Studie konnte zeigen, dass Kinder, die aufgrund eines Osteosarkoms mit (12 000 mg/m²) HD-MTX behandelt werden mussten, höhere MTX-Spiegel aufwiesen, wenn sie die GG-Allelkombination des *SLC19A1* besaßen. Die höheren Plasmaspiegel waren wiederum assoziiert mit schwergradigen Mukositiden und renalen Nebenwirkungen⁶³. Lima *et al.* konnten höhere gastrointestinale Toxizitäten bei Erwachsenen mit rheumatoider Arthritis feststellen, wenn diese mindestens ein G-Allel besaßen^{87,88}. Dieses Ergebnis hielt jedoch der von Li *et al.* durchgeführten Metaanalyse nicht stand, die u.a. den Einfluss des G80A-SNP auf MTX-assoziierte Toxizitäten bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis untersuchte⁷⁸.

Da in vielen Studien entweder nur Erwachsene oder Kinder betrachtet wurden, könnte auch das Alter der Patienten eine Rolle spielen. Möglicherweise sind die

Expressionslevel des Transporters, sowie der daraus resultierende Einfluss eines bestimmten SNP auf die Toxizitätsausprägungen zu bestimmten Zeitpunkten des Lebens in verschiedenen Geweben unterschiedlich groß. Zudem muss beachtet werden, dass nicht nur unterschiedliche Krankheitsbilder mit jeweils spezifischer Pathophysiologie untersucht wurden, sondern auch dass in vielen Studien sowohl die MTX-Dosis als auch der Aufnahmeweg verschieden waren (z.B. Hochdosis-MTX -> i.v., Niedrigdosis-MTX -> p.o.). Eventuell wird der Effekt der verschiedenen Allele zudem erst über oder unter einer bestimmten (Schwellen-)MTX-Dosis sichtbar.

Sicher sind die MTX-Pharmakodynamik und der MTX-Stoffwechsel zu komplex, als dass man die auftretenden Toxizitäten anhand eines einzelnen SNP zu beschreiben oder vorherzusagen vermag. Allein *SLC19A1* hat mehr als 14 SNPs; bei einigen wurde ebenfalls ein Einfluss auf Toxizitätsausprägungen beschrieben (z.B. rs4819128⁸⁹ oder rs2838958^{90,91}). Andere wiederum konnten keinen Einfluss der untersuchten *SLC19A1* SNPs feststellen^{67,92,93}. Ein Einfluss auf Toxizität und Therapieeffekt konnte zudem für vielerlei Polymorphismen in einer Vielzahl von Genen beschrieben werden, die im MTX-Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielen, so wie beispielsweise bei den Transportproteinen *SLCO1B1*^{67,92,94}, *ABCC2/MRP2*^{93,95,96} und *ABCC4/MRP4*^{73,97}, als auch bei verschiedenen Enzymen, wie z.B. DHFR, SHMT, TYMS und MTHFR^{40,81,98}. Vermutlich können nur größere Haplotyp-Studien dabei helfen, einen Einfluss von Allelkombinationen mehrerer SNPs unterschiedlicher Genorte auf die MTX-Wirkung zu entschlüsseln. Weiterhin müsste der Einfluss einer Trisomie 21 auf den MTX-Stoffwechsel genauer untersucht werden, um besser verstehen zu können, welche Chromosom 21-abhängigen Gene darin – direkt oder indirekt – involviert sind. Einen ersten Ansatzpunkt dazu könnten Transcriptome- und/oder Micro-Array Daten liefern^{65,99}.

Des Weiteren sollte auch der Expressionsstärke der involvierten Proteine und Transporter Aufmerksamkeit geschenkt werden, da beispielsweise *SLC19A1* in Zellen von DS als auch in hyperploiden ALL-Blasten mit zusätzlichem Chromosom 21 (von jedoch euploiden ALL-Patienten) stärker exprimiert wird^{65,100}. Unterschiedliche hohe Expressionslevel auf mRNA- oder Proteinebene könnten daher möglicherweise eine Erklärung für die beobachtete ungleiche Suszeptibilität gegenüber MTX innerhalb der Gruppe der DS-ALL-Patienten liefern.

7. Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine größere DS-ALL-Kohorte bezüglich zahlreicher Toxizitäten nach HD-MTX-Gabe beschrieben. Neben der Toxizitätsausprägung wurden zudem Dosisanpassungen und Verläufe für spätere HD-MTX-Blöcke untersucht. Hier konnte u.a. gezeigt werden, dass eine Dosissteigerung bei DS-Patienten mit initial niedriger MTX-Dosis und wenigen Nebenwirkungen durchaus sicher ist. Dies ist sehr positiv zu bewerten, da einige Studien zeigen konnten, dass DS-ALL-Patienten, die eine reduzierte Therapie verabreicht bekamen, ein signifikant schlechteres Outcome hatten^{19,35}. Derouet *et al.* und Shah *et al.* hingegen konnten keine Unterschiede bei OS oder EFS zwischen dosisreduzierten und normaldosierten DS-ALL-Patienten feststellen. Die Autoren mutmaßen, dass eine Dosisreduktion mittlerweile kein Nachteil mehr für DS-Patienten darstellt, weil die supportive Therapie, sowie die gesamte ALL-Therapie (also auch inklusive aller anderen Therapieelemente) besser/effektiver geworden ist. Auch andere konnten ein besseres Outcome für DS-ALL in der neueren Zeit feststellen^{17,21}. Sicher wäre angesichts dieser Tatsache ein Vergleich des OS und EFS zwischen DS-ALL-Patienten mit durchgehend niedriger Dosis in Protokoll M (LLLL) und Patienten die im Verlauf gesteigert wurden (Lsteig) sehr interessant. Möglicherweise könnte man durch das vorsichtige Aufdosieren von MTX das Outcome für DS-ALL-Patienten noch verbessern, im Vergleich zu Patienten, die durchgehend eine reduzierte MTX-Therapie erhalten.

Maloney *et al.* vermuten dass die DS-ALL v.a. deshalb ein schlechteres Outcome hat, weil sie weniger häufig prognostisch günstige zytogenetische Veränderungen aufweist^{21,101}. Daher spekulieren Izraeli *et al.* darüber, ob DS-ALL-Patienten mit prognostisch günstigen *ETV6-RUNX*-Translokationen oder hyperdiploider ALL von einer MTX-Dosisreduktion möglicherweise sogar profitieren könnten, da so die Therapie-assoziierte Toxizitäten und evtl. auch die Zahl der Therapie-assoziierten Todesfälle reduziert werden könnte⁶⁸.

Goto *et al.* schlagen vor, dass DS-ALL-Patienten tendenziell eher eine niedrigere MTX-Dosis erhalten sollten. Dafür sollte deren Therapie mit neuen Medikamenten, wie z.B. JAK-Inhibitoren erweitert werden³⁵. DS-ALL-Blasten haben in 20% der Fälle aktivierende Mutationen in der Tyrosinkinase JAK2 und insgesamt 60% zeigen aktivierende Veränderungen im CRLF2-Signalweg, der ebenfalls über JAK2 und

STAT5 zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen führen kann, beispielsweise über eine aktivierende Mutation an Position 232 (F232C) oder über *P2RY8-CRLF2*- bzw. *IGH@-CRLF2*-Translokationen^{30,32,102}. JAK-Inhibitoren, wie Ruxolitinib oder Momelotinib, könnten daher bei der Behandlung einer DS-ALL sehr hilfreich sein^{32,68}. Auch der Einsatz des CD19/CD3-bispezifischen Antikörpers Blinatumomab könnte für DS-ALL-Patienten einen Nutzen zeigen¹⁰³. Diese neuen und möglicherweise sehr wirkungsvollen Therapeutika könnten – entsprechende Verträglichkeit vorausgesetzt – auch dazu beitragen, dass Patienten mit DS-ALL nicht mehr auf sehr hohe MTX-Dosen für ein gutes Outcome angewiesen sind.

Um die Therapie für DS-ALL weiter zu optimieren, sollte auch der Erhaltungstherapie mehr Beachtung geschenkt werden: Bei DS-ALL-Patienten treten hier ungefähr 40% der Therapie-assoziierten Todesfälle auf²¹. Insgesamt zeigen DS-Patienten, die die Dauertherapie durchlaufen, ein signifikant schlechteres 10-Jahres-EFS als vergleichbare NDS-ALL-Patienten⁷⁶. Außerdem erhalten sie im Schnitt niedrigere Dosen an MTX und 6-MP; beides Medikamente, für die bei DS ein veränderter Stoffwechsel beschrieben wurde⁷². Auch das Auftreten von Therapie-assoziierten Toxizitäten während der Erhaltungstherapie sollte untersucht werden und mit den in der HD-MTX-Therapiephase aufgetretenen Toxizitäten verglichen werden.

Diese Ansätze könnten DS-ALL-Patienten helfen, eine bessere Balance zwischen möglichst niedriger Therapie-assoziiierter Toxizität und hoher Therapieeffektivität zu finden und schließlich für DS-ALL ein vergleichbar gutes Outcome wie für NDS-ALL zu erreichen.

Zusammenfassung: Methotrexat-assoziierte Toxizität bei Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie und Down Syndrom

Kinder mit Down Syndrom (DS) besitzen ein zusätzliches Chromosom 21 und haben ein ca. 30-fach erhöhtes Risiko an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) zu erkranken (DS-ALL). Sie stellen einen Anteil von bis zu 5% aller pädiatrischen ALL-Patienten und zeigen ein schlechteres Outcome als vergleichbare euploide Kinder (Non-DS, NDS) mit ALL (NDS-ALL). Dies ist v.a. der Tatsache geschuldet, dass DS-ALL stärker unter Therapie-assoziierten Nebenwirkungen leiden. Daher erhalten sie oft eine dosisreduzierte ALL-Therapie. Besonders empfindlich reagieren DS auf den Folsäureantagonist Methotrexat (MTX), der bei ihnen u.a. schwerste Mukositiden auslösen kann. MTX wird u.a. im Protokoll M der ALL-BFM-Therapieprotokolle viermalig als Hochdosis-MTX (HD-MTX) verabreicht. Diese Arbeit ist die bisher größte Untersuchung zu MTX-assoziierten Toxizitäten bei DS-ALL und soll helfen, die auftretenden Toxizitäten nach HD-MTX-Gabe besser zu verstehen. Ausgewertet wurden dazu klinische Daten von 103 DS-ALL- und 1109 NDS-ALL-Patienten aus drei ALL-BFM-Studien (der Jahre 1995, 2000 und 2009) bzgl. in Protokoll M verabreichter MTX-Dosis, dem Auftreten bzw. Schweregrad von verschiedenen Toxizitäten sowie den MTX-Plasmaspiegeln. Insgesamt zeigten DS-ALL signifikant häufiger Grad 3 und 4 Toxizitäten als NDS-ALL. DS-ALL, die – wie mittlerweile empfohlen – eine um 90% reduzierte MTX-Dosis erhielten, litten im Vergleich zu DS-ALL mit voller Dosis signifikant weniger häufig an Grad 3 und 4 Toxizitäten. Jedoch zeigten sie signifikant stärkere Toxizitäten als NDS-ALL, die die volle MTX-Dosis erhielten. Diese Beobachtung ließ sich nicht durch veränderte MTX-Plasmaspiegel erklären. Vorsichtige Dosissteigerungen bei DS-ALL, die zuvor eine niedrigdosierte MTX-Gabe gut vertrugen, führten zu keinem Anstieg der Toxizität und können daher als sicher betrachtet werden. Dosisreduktionen bei DS-ALL, die nach Erhalt einer hohen MTX-Dosis unter starker Toxizität litten, halfen die Nebenwirkungen abzumildern. Um eine Erklärung für die klinisch beobachtete unterschiedliche Suszeptibilität für MTX-assoziierte Toxizitäten innerhalb der DS-ALL-Kohorte zu finden, wurde der Einfluss des Single-nucleotide-Polymorphismus rs1051266 des auf Chromosom 21 kodieren Folat- und MTX-Transporters *SLC19A1* untersucht. Hierbei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem höher aktiven A-Allel und einer stärker ausgeprägten Toxizität festgestellt werden.

Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P. Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treatment Reviews* **36**, 277–285 (2010).
2. Bene, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783–1786 (1995).
3. Harrison, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **144**, 147–156 (2009).
4. Pui, C.-H. *et al.* Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 2938–2948 (2015).
5. Hattori, M. *et al.* The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**, 311–319 (2000).
6. Gardiner, K., Fortna, A., Bechtel, L. & Davisson, M. T. Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* **318**, 137–147 (2003).
7. Down, J. L. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports* **3**, 259–262 (1866).
8. Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A. & Deutsch, S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 725–738 (2004).
9. Malt, E. A. *et al.* Health and disease in adults with Down syndrome. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **133**, 290–294 (2013).
10. Hasle, H., Clemmensen, I. H. & Mikkelsen, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* **355**, 165–169 (2000).
11. Seewald, L., Taub, J. W., Maloney, K. W. & McCabe, E. R. B. Acute leukemias in children with Down syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism* **107**, 25–30 (2012).
12. Roberts, I. & Izraeli, S. Haematopoietic development and leukaemia in Down syndrome. *Br J Haematol* **167**, 587–599 (2014).
13. Roy, A. *et al.* Perturbation of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cell development by trisomy 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 17579–17584 (2012).
14. Kusters, M. A., Verstegen, R. H. & de Vries, E. Down syndrome: is it really characterized by precocious immunosenescence? *Aging Dis* **2**, 538–545 (2011).
15. Kusters, M. A. A., Verstegen, R. H. J., Gemen, E. F. A. & de Vries, E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin. Exp. Immunol.* **156**, 189–193 (2009).
16. Ram, G. & Chinen, J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 9–16 (2011).
17. Whitlock, J. A. *et al.* Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* **106**, 4043–4049 (2005).
18. Mezei, G., Sudan, M., Izraeli, S. & Kheifets, L. Epidemiology of childhood leukemia in the presence and absence of Down syndrome. *Cancer Epidemiol* **38**, 479–489 (2014).
19. Dordelmann, M. *et al.* Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials. Berlin-Frankfurt-Münster Group. *Leukemia* **12**, 645–651 (1998).
20. Forestier, E. *et al.* Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. *Blood* **111**, 1575–1583 (2008).
21. Buitenkamp, T. D. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood* **123**, 70–77 (2014).
22. Lundin, C. *et al.* Clinical and genetic features of pediatric acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome in the Nordic countries. *J Hematol Oncol* **7**, 32 (2014).
23. Bercovich, D. *et al.* Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* **372**, 1484–1492 (2008).
24. Malinge, S. *et al.* Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **109**, 2202–2204 (2007).
25. Kearney, L. *et al.* Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **113**, 646–648 (2009).
26. Gaikwad, A. *et al.* Prevalence and clinical correlates of JAK2 mutations in Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **144**, 930–932 (2009).
27. Izraeli, S. Similar yet different. *Blood* **116**, 1019–1020 (2010).

28. Mullighan, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics* **41**, 1243–1246 (2009).
29. Russell, L. J. *et al.* Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 2688–2698 (2009).
30. Cario, G. *et al.* Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood* **115**, 5393–5397 (2010).
31. Hertzberg, L. *et al.* Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood* **115**, 1006–1017 (2010).
32. Lee, P., Bhansali, R., Izraeli, S., Hijiya, N. & Crispino, J. D. The biology, pathogenesis and clinical aspects of acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. *Nature Publishing Group* 1–8 (2016). doi:10.1038/leu.2016.164
33. Whitlock, J. A. Down syndrome and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **135**, 595–602 (2006).
34. Arico, M. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome. *Cancer* **113**, 515–521 (2008).
35. Goto, H. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome: the collaborative study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and the Kyushu Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Int. J. Hematol.* **93**, 192–198 (2011).
36. Taub, J. W. & Ge, Y. Down syndrome, drug metabolism and chromosome 21. *Pediatr. Blood Cancer* **44**, 33–39 (2004).
37. Buitenkamp, T. D., Mathot, R. A. A., de Haas, V., Pieters, R. & Zwaan, C. M. Methotrexate-induced side effects are not due to differences in pharmacokinetics in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **95**, 1106–1113 (2010).
38. Chabner, B. A. *et al.* Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? *Journal of Clinical Investigation* **76**, 907–912 (1985).
39. Schmiegelow, K., Nielsen, S. N., Frandsen, T. L. & Nersting, J. Mercaptopurine/Methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **36**, 503–517 (2014).
40. Schmiegelow, K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. *Br J Haematol* **146**, 489–503 (2009).
41. Schmeling, H., Horneff, G., Benseler, S. M. & Fritzler, M. J. Pharmacogenetics: can genes determine treatment efficacy and safety in JIA? *Nat Rev Rheumatol* **10**, 682–690 (2014).
42. Bernard, S., Etienne, M. C., Fischel, J. L., Formento, P. & Milano, G. Critical factors for the reversal of methotrexate cytotoxicity by folinic acid. *Br J Cancer* **63**, 303–307 (1991).
43. Widemann, B. C. & Adamson, P. C. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* **11**, 694–703 (2006).
44. Widemann, B. C. *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of the methotrexate metabolite 2, 4-diamino-N(10)-methylpterotic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 894–901 (2000).
45. Matherly, L. H., Wilson, M. R. & Hou, Z. The Major Facilitative Folate Transporters Solute Carrier 19A1 and Solute Carrier 46A1: Biology and Role in Antifolate Chemotherapy of Cancer. *Drug Metabolism and Disposition* **42**, 632–649 (2014).
46. Whetstine, J. R., Flatley, R. M. & Matherly, L. H. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem. J.* **367**, 629–640 (2002).
47. Moscow, J. A. Methotrexate transport and resistance. *Leukemia & Lymphoma* **30**, 215–224 (1998).
48. Moscow, J. A. *et al.* Reduced folate carrier gene (RFC1) expression and anti-folate resistance in transfected and non-selected cell lines. *Int. J. Cancer* **72**, 184–190 (1997).
49. Liu, M. *et al.* Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 608–616 (2006).
50. Flatley, R. M., Payton, S. G., Taub, J. W. & Matherly, L. H. Primary acute lymphoblastic leukemia cells use a novel promoter and 5'noncoding exon for the human reduced folate carrier that encodes a modified carrier translated from an upstream translational start. *Clin. Cancer Res.* **10**, 5111–5122 (2004).
51. Subramanian, V. S., Chatterjee, N. & Said, H. M. Folate uptake in the human intestine: Promoter activity and effect of folate deficiency. *J Cell Physiol* **196**, 403–408 (2003).
52. Ifergan, I., Jansen, G. & Assaraf, Y. G. The reduced folate carrier (RFC) is cytotoxic to cells under conditions of severe folate deprivation. RFC as a double edged sword in folate homeostasis. *J. Biol. Chem.* **283**, 20687–20695 (2008).

53. Matherly, L. H., Czajkowski, C. A. & Angeles, S. M. Identification of a highly glycosylated methotrexate membrane carrier in K562 human erythroleukemia cells up-regulated for tetrahydrofolate cofactor and methotrexate transport. *Cancer Res.* **51**, 3420–3426 (1991).
54. Matherly, L. H., Hou, Z. & Deng, Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 111–128 (2007).
55. Yee, S. W. *et al.* SLC19A1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenetics and Genomics* **20**, 708–715 (2010).
56. Rady, P. L. *et al.* Genetic polymorphism (G80A) of reduced folate carrier gene in ethnic populations. *Molecular Genetics and Metabolism* **73**, 285–286 (2001).
57. Chango, A., Willequet, F., Fillon-Emery, N., Nicolas, J. P. & Bléhaut, H. The single nucleotide polymorphism (80G→A) of reduced folate carrier gene in trisomy 21. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1667–1669 (2004).
58. Baslund, B., Gregers, J. & Nielsen, C. H. Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B cells and CD4+ T cells. *Rheumatology* **47**, 451–453 (2007).
59. Whetstine, J. R. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3416–3422 (2001).
60. Gregers, J. *et al.* The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* **115**, 4671–4677 (2010).
61. Chiusolo, P. *et al.* The role of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicity and outcome of adult patients with hematological malignancies treated with high-dose methotrexate followed by leucovorin rescue. *Cancer Chemother Pharmacol* **69**, 691–696 (2011).
62. Laverdière, C., Chiasson, S., Costea, I., Moghrabi, A. & Krajcinovic, M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **100**, 3832–3834 (2002).
63. Park, J. A. & Shin, H. Y. Influence of genetic polymorphisms in the folate pathway on toxicity after high-dose methotrexate treatment in pediatric osteosarcoma. *Blood Res* **51**, 50 (2016).
64. Kishi, S. *et al.* Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. *Blood* **109**, 4151–4157 (2007).
65. Ait Yahya-Graison, E. *et al.* Classification of Human Chromosome 21 Gene-Expression Variations in Down Syndrome: Impact on Disease Phenotypes. *The American Journal of Human Genetics* **81**, 475–491 (2007).
66. Hinze, L. *et al.* Prognostic impact of IKZF1 deletions in association with vincristine-dexamethasone pulses during maintenance treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia on trial ALL-BFM 95. *Leukemia* **31**, 1840–1842 (2017).
67. Radtke, S. *et al.* Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **121**, 5145–5153 (2013).
68. Izraeli, S., Vora, A., Zwaan, C. M. & Whitlock, J. How I treat ALL in Down's syndrome: pathobiology and management. *Blood* **123**, 35–40 (2014).
69. Shah, N. *et al.* Outcome and toxicity of chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children with down syndrome. *Pediatr. Blood Cancer* **52**, 14–19 (2009).
70. Derouet, A. *et al.* Impact of therapy in a cohort of unselected children with Down Syndrome-associated Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Br J Haematol* **174**, 983–985 (2016).
71. Garré, M. L. *et al.* Pharmacokinetics and toxicity of methotrexate in children with Down syndrome and acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr.* **111**, 606–612 (1987).
72. Hefti, E. & Blanco, J. G. Pharmacokinetics of Chemotherapeutic Drugs in Pediatric Patients With Down Syndrome and Leukemia. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **38**, 283–287 (2016).
73. Hoed, den, M. A. H. *et al.* Genetic and metabolic determinants of methotrexate-induced mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* **15**, 248–254 (2014).
74. Martelli, N. *et al.* Methotrexate pharmacokinetics in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prognostic value ? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **36**, 237–245 (2010).
75. Palle, J. *et al.* Thioguanine pharmacokinetics in induction therapy of children with acute myeloid leukemia. *Anti-Cancer Drugs* **20**, 7–14 (2009).
76. Bohnstedt, C. *et al.* Physicians compliance during maintenance therapy in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Nature Publishing Group* **27**, 866–870 (2013).
77. Tazoe, Y. *et al.* Reduced folate carrier 1 gene expression levels are correlated with methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **30**, 227–230 (2015).
78. Li, X. *et al.* The association between reduced folate carrier-1 gene 80G/A polymorphism and

- methotrexate efficacy or methotrexate related-toxicity in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *International Immunopharmacology* **38**, 8–15 (2016).
79. Chango, A. *et al.* A Polymorphism (80G->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. *Molecular Genetics and Metabolism* **70**, 310–315 (2000).
 80. He, H.-R. *et al.* Association between reduced folate carrier G80A polymorphism and methotrexate toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & Lymphoma* **55**, 2793–2800 (2014).
 81. Huang, L., Tissing, W. J. E., de Jonge, R., van Zelst, B. D. & Pieters, R. Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Publishing Group* **22**, 1798–1800 (2008).
 82. Kishi, S. *et al.* Homocysteine, Pharmacogenetics, and Neurotoxicity in Children With Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 3084–3091 (2003).
 83. Shimasaki, N. *et al.* Influence of MTHFR and RFC1 Polymorphisms on Toxicities During Maintenance Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 347–352 (2008).
 84. Rocha, J. C. C. *et al.* Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **105**, 4752–4758 (2005).
 85. Suthandiram, S. *et al.* Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics* **15**, 1479–1494 (2014).
 86. Shimasaki, N. *et al.* Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **28**, 64–68 (2006).
 87. Lima, A. *et al.* SLC19A180G allele as a biomarker of methotrexate-related gastrointestinal toxicity in Portuguese rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics* **15**, 807–820 (2014).
 88. Lima, A. *et al.* SLC19A1, SLC46A1 and SLC01B1 Polymorphisms as Predictors of Methotrexate-Related Toxicity in Portuguese Rheumatoid Arthritis Patients. *Toxicological Sciences* **142**, 196–209 (2014).
 89. Vujkovic, M. *et al.* Associations between genetic variants in folate and drug metabolizing pathways and relapse risk in pediatric acute lymphoid leukemia on CCG-1952. *Leukemia Research Reports* **4**, 47–50 (2AD).
 90. Liu, S.-G. *et al.* Polymorphisms in methotrexate transporters and their relationship to plasma methotrexate levels, toxicity of high-dose methotrexate, and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* **8**, 37761–37772 (2017).
 91. Kotnik, B. F., Jazbec, J., Grabar, P. B., Rodriguez-Antona, C. & Dolzan, V. Association between SLC19A1 Gene Polymorphism and High Dose Methotrexate Toxicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia and Non Hodgkin Malignant Lymphoma: Introducing a Haplotype based Approach. *Radiol Oncol* **51**, 455–462 (2017).
 92. Treviño, L. R. *et al.* Germline Genetic Variation in an Organic Anion Transporter Polypeptide Associated With Methotrexate Pharmacokinetics and Clinical Effects. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 5972–5978 (2009).
 93. Lopez Lopez, E. *et al.* Polymorphisms in the methotrexate transport pathway. *Pharmacogenetics and Genomics* **23**, 53–61 (2013).
 94. Lopez Lopez, E. *et al.* Polymorphisms of the SLC01B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **57**, 612–619 (2011).
 95. Liu, Y. *et al.* Association of ABCC2 –24C>T Polymorphism with High-Dose Methotrexate Plasma Concentrations and Toxicities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE* **9**, e82681 (2014).
 96. Simon, N. *et al.* Impact of ABCC2 polymorphisms on high-dose methotrexate pharmacokinetics in patients with lymphoid malignancy. *The Pharmacogenetics Journal* **13**, 507–513 (2013).
 97. Ansari, M. *et al.* Polymorphisms in multidrug resistance-associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 1383–1386 (2009).
 98. D'Angelo, V. *et al.* Methotrexate toxicity and efficacy during the consolidation phase in paediatric acute lymphoblastic leukaemia and MTHFR polymorphisms as pharmacogenetic determinants. *Cancer Chemother Pharmacol* **68**, 1339–1346 (2011).
 99. Prandini, P. *et al.* Natural Gene-Expression Variation in Down Syndrome Modulates the Outcome of Gene-Dosage Imbalance. *The American Journal of Human Genetics* **81**, 252–263 (2007).

100. Zhang, L. *et al.* Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2169–2177 (1998).
101. Maloney, K. W. *et al.* Down syndrome childhood acute lymphoblastic leukemia has a unique spectrum of sentinel cytogenetic lesions that influences treatment outcome: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* **116**, 1045–1050 (2010).
102. Izraeli, S. The acute lymphoblastic leukemia of Down Syndrome - Genetics and pathogenesis. *European Journal of Medical Genetics* 1–4 (2015).
doi:10.1016/j.ejmg.2015.11.010
103. Wadhwa, A., Kutny, M. A. & Xavier, A. C. Blinatumomab activity in a patient with Down syndrome B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **65**, e26824 (2017).
104. Pui, C.-H. *et al.* New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 149-165 (2007)
105. Pui, C.-H. *et al.* Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and do we get there? *Blood* **120**, 1165–1174 (2012).

Danksagung

Herzlich bedanken für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich bei:

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Gunnar Cario. Nicht nur für die Planung und kompetente Betreuung des Projekts, sondern auch für die Freiheiten, die mir bei der Bearbeitung gelassen wurden.

Dr. Anja Möricke für die vielen Ideen, guten Vorschläge, die mühsame Rohdatenzusammenstellung und die spannenden Diskussionen.

Den Mitarbeiterinnen des MRD-Labor, v.a. bei Martina Kähler, Sabine Prigge und Alexandra Pfaff für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen bei der Laborarbeit und allen Mitarbeitern/innen der ALL-BFM-Studienzentrale.

PD Dr. Denis Schewe und sein Labor sowie Dr. Almeera Alsadeq für die Unterstützung bei der Projektplanung und im Labor.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Kirsten Kaupat-Bleckmann, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Vor allem für ihre intensive fachliche und organisatorische Unterstützung sowie die vielen aufmunternden Worte.

Dank gilt auch der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung und der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie für die finanzielle Unterstützung.

Für persönliche Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Frau Ina für ihre Liebe und ihre Geduld bedanken. Ebenso danken möchte ich meiner Mutter Heidi (mögest Du in Frieden ruhen) und meinem Vater Wolfgang sowie meinem Bruder Thorben und seiner Familie. Weiterhin danken möchte ich Kurt.